P.11
CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES
2 3 DEC. 1976
VERSAILLES

annales de technologie agricole

Trimestriel

1976

Vol. 25 . N° 1

inra

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Ann. Technol. agric. ATAPAA 25 (1) 1-115 (1976)
FR ISSN 0003-4223

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

149, rue de Grenelle, 75007 PARIS, Tél. : 551-41-09.

Directeur général : R. FÉVRIER

Directeur général adjoint : J. POLY

Inspecteurs généraux : E. BILIOTTI, P. BOUVAREL, R. BOUCHET, C. CALET, A. CAUDERON, G. FAUCONNEAU, G. JOLIVET, R. PÉRO, J. REBISCHUNG

Rédaction des Annales

Pour l'ensemble des Séries : J. POLY

Annales agronomiques.

— J. CHAUSSIDON, Chef du Département de Science du sol, C. N. R. A.
— L. GACHON, Chef du Département d'Agronomie, 63100 Clermont-Ferrand.
— M. HALLAIRE, Chef du Département de Bioclimatologie, C. N. R. A.

Annales de l'Amélioration des Plantes.

— M. RIVES, Chef du Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes, I. N. R. A., 11, rue Jean-Nicot, 75007 Paris.

Annales de Phytopathologie.

— J. PONCHET, Chef du Département de Pathologie végétale, 06602 Antibes.

Annales de Zoologie - Écologie animale.

— E. BILIOTTI, Inspecteur général de la Recherche agronomique.

Annales de Zootechnie.

— A.-M. LEROY, Professeur honoraire à l'Institut national agronomique.
— A. RÉRAT, Chef du Département de Nutrition, C. N. R. Z.

Annales de Technologie agricole.

— P. DUPUY, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, 21034 Dijon Cedex.
— A. GUILBOT, Directeur de la Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales et de leurs Dérivés C. E. R. D. I. A., Le Noyer-Lambert, 91300 Massy.
— B. L. DUMONT, Directeur du Laboratoire de Recherches sur la Viande, C. N. R. Z.

Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique.

— C. THIBAULT, Directeur de Recherches à l'I. N. R. A., C. N. R. Z.

Annales des Sciences forestières.

— P. BOUVAREL, Inspecteur général de la Recherche agronomique, Chef du Département de Recherches forestières, C. N. R. F.
— J. PARDÉ, Directeur de la Station de Sylviculture et de Production, C. N. R. F.

Annales de Génétique et de Sélection animale.

— P. MÉRAT, Directeur de la Station de Génétique factorielle, C. N. R. Z.
— B. VISSAC, Chef du Département de Génétique animale, C. N. R. Z.

Apidologie (Revue franco-allemande, co-édition I. N. R. A.-Deutscher-Imkerbund).

— J. LOUVEAUX, Directeur de la Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes sociaux, 91440 Bures sur Yvette.

Annales de Recherches vétérinaires.

— P. LARVOR, Directeur de la Station de Physiopathologie de la Nutrition, Theix, Saint Genès Champanelle, 63110 Beaumont.

Annales d'Hydrobiologie.

J. LECOMTE, Chef du Département d'Hydrobiologie, C. N. R. A.

ADMINISTRATION ET SECRÉTARIAT DE LA RÉDACTION

Service des Publications de l'I. N. R. A., route de Saint-Cyr, 78000 VERSAILLES, Tél. : 950-75-22

annales de technologie agricole

Trimestriel

1976

Vol. 25 . N° 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (1), 1-27.

DISTRIBUTION STATISTIQUE DES TENEURS EN EAU DANS UNE POPULATION DE GRAINS DE MAÏS

G. BEULLIER et J.-L. MULTON

Station de Biochimie et Physicochimie des Céréales,
I. N. R. A., C. E. R. D. I. A.,
91305 Massy

RÉSUMÉ

Pour apprécier l'aptitude du maïs à la conservation, on ne tient compte que de la teneur en eau moyenne mesurée sur un nombre élevé de grains. Or, la teneur en eau n'est pas identique dans tous les grains, les plus humides créant les risques les plus élevés d'altération.

Une méthode de référence mise au point pour l'étude de la dispersion de teneurs en eau est discutée ; elle consiste en un étuvage à 130°C pendant 38 heures des grains entiers isolés dans chacune des 10 alvéoles d'une capsule multi-alvéolaire (CM) elle-même placée dans une étuve Chopin. Les différents paramètres du mode opératoire sont alors discutés. L'effectif de chaque mesure ayant été fixé à 30, la température et la durée d'étuvage ont été déterminées de manière à obtenir pour chaque CM une valeur moyenne comparable aux résultats obtenus par des dosages d'eau classiques. Le calcul d'erreur montre que la teneur en eau d'un grain de maïs est connue à ± 0,07 p. 100 (valeur absolue). La place des grains dans la CM, l'ordre de traitement et la position des CM dans l'étuve, les poids secs et humides des grains, n'ont aucun effet significatif.

La méthode est appliquée à l'étude de la distribution des teneurs en eau entre grains. On montre qu'elle est gaussienne, avec des coefficients de variation se situant entre 2 et 5 p. 100. La distribution des teneurs en eau est corrélative de la distribution des humidités relatives en équilibre avec les grains et indépendante de celle du poids des grains. La teneur en eau des grains au repos tend à s'homogénéiser, jusqu'à un seuil minimal de ± 0,3 p. 100 en valeur absolue.

Quelques exemples d'application pratique de la méthode sont enfin présentés.

Mots clés : *humidité, maïs, dosage, distribution.*

INTRODUCTION

Le maïs joue un rôle croissant dans l'économie industrielle agricole (DAUPHIN, 1970), en particulier dans le secteur de l'alimentation du bétail. Or, le maïs normalement très humide lorsqu'il arrive à maturité (BLOC et GOUET, 1974) tend à être

collecté à une teneur en eau de plus en plus élevée en raison, d'une part de la plus grande précocité de la récolte, conséquence de la mécanisation, et d'autre part du fait que la culture s'est étendue vers des zones climatiques plus humides.

Ce phénomène est même apparu aux U. S. A. (KLINE, 1973) où traditionnellement le maïs était jusqu'à présent récolté relativement sec (teneur en eau inférieure à 25-27 p. 100). Il en résulte que, pour assurer une bonne conservation du maïs, il faut soit le sécher rapidement et le stocker en maintenant température et humidité à un niveau convenable, soit le stocker humide grâce à des techniques appropriées (MULTON *et al.*, 1969 ; MULTON, 1974 ; MULTON et GUILBOT, 1974).

Pour apprécier la teneur en eau, paramètre essentiel qui régit les phénomènes d'altération des grains, on ne prend jusqu'à présent en considération que la valeur moyenne relative à un nombre important de grains, telle qu'elle est donnée par les dosages classiques (GUILBOT *et al.*, 1973 ; MULTON *et al.*, 1974). Il existe autour de cette valeur moyenne une dispersion naturelle des teneurs en eau de chaque grain pris individuellement ; celle-ci est aggravée par les opérations de séchage (hétérogénéité de température dans l'appareil, cycles de régulation) ou par les mélanges de grains secs et de grains humides parfois effectués en vue d'obtenir un lot de teneur en eau commerciale. Or, ce sont les grains les plus humides qui constituent les foyers privilégiés d'activité des systèmes enzymatiques et de développement de la microflore, foyers qui ensuite se propagent très rapidement de proche en proche : c'est pourquoi il est au moins aussi utile de connaître la distribution en teneurs en eau que la valeur moyenne, pour apprécier des possibilités de conservation.

La connaissance des dispersions de teneurs en eau grain par grain est par ailleurs indispensable pour une meilleure connaissance des causes d'erreur de répétabilité des méthodes classiques du dosage de l'eau (MULTON *et al.*, 1975).

Pour toutes ces raisons, il est apparu indispensable de pouvoir disposer d'une technique de dosage de l'eau « grain par grain ». Le but de ce travail est précisément de présenter la méthode de référence mise au point, ainsi que d'en discuter quelques applications pratiques caractéristiques.

I. — ÉTUDE D'UNE MÉTHODE DE RÉFÉRENCE POUR LE DOSAGE DE L'EAU « GRAIN PAR GRAIN »

Il n'existe à ce jour qu'un nombre extrêmement réduit d'études consacrées au dosage de l'eau grain par grain. L'examen des plus approfondies, celles d'OXLEY (1948) dans le cas du blé, de HART (1967) et de GREENAWAY (1974) dans le cas du maïs montre que, malgré une approche intéressante du problème, il n'existe pas vraiment de méthode de dosage bien définie pouvant être considérée comme méthode de référence, support indispensable pour pouvoir aborder des problèmes de natures diverses (hétérogénéité d'un lot, détection d'un mélange, étalonnage d'appareils automatiques de mesure « grain par grain » de la teneur en eau.)

C'est donc vers l'élaboration de cette méthode de référence que nous avons orienté notre travail, en nous fixant comme règle essentielle qu'elle soit aussi proche que possible, dans son principe et sa mise en œuvre, des méthodes actuellement nor-

malisées, ou en cours de normalisation, pour le dosage de la teneur en eau moyenne, au niveau des organismes nationaux ou internationaux, I.C.C. (Association Internationale de Chimie Céréalière), I.S.O. (International Standardization Organization), et AFNOR (Association Française de Normalisation), en particulier.

Tous nos essais ont été réalisés sur du maïs hybride *I. N. R. A. 260*, cultivé et récolté par l'I.T.C.F. (Institut Technique des Céréales et des Fourrages) à Boigneville, et conservé à une teneur en eau voisine de 16 p. 100, à 7°C (lots témoins T_1 et T_2).

A. — *Méthodologie*

Après un examen critique, nous avons écarté le principe des méthodes de référence fondamentales et pratiques (I.C.C., 1960 ; I.S.O., 1965), qui implique un broyage préalable de l'échantillon, très difficile à réaliser sur un seul grain, pour ne retenir que la méthode pratique d'évaluation de la teneur en eau des maïs (AFNOR, 1973) ; le principe de cette méthode (étuvage à 130°C des grains entiers pendant 38 heures) est en effet facilement transposable à des grains pris isolément.

1. *Appareillage.*

Les appareils nécessaires au dosage de l'eau « grain par grain » sont les suivants :

a) Balance analytique, précision 0,01 mg.

b) Dessiccateur garni d'anhydride phosphorique.

c) Étuve multicellulaire Chopin grand modèle ; le choix de cette étuve est justifié par sa très grande homogénéité thermique, sa très grande inertie thermique et l'excellence de sa régulation qui en font la meilleure actuellement disponible sur le marché (DAVIN et GUILBOT, 1964 ; GUILBOT *et al.*, 1973).

d) Échantillonneur de laboratoire, par exemple l'échantillonneur conique du C.N.T.A. (Centre National Technique Agricole).

e) Au moins 3 « capsules multi-alvéolaires » (fig. 1) ; celles-ci sont désignées par « CM » dans la suite du texte ; chacune d'entre elles est constituée d'une barre de section carrée dans laquelle sont usinées 10 alvéoles de dimensions (diamètre : 15 mm ; hauteur : 10 mm) telles qu'on puisse y placer un grain de maïs ; un couvercle coulissant permet d'isoler de l'atmosphère chaque alvéole de la CM ; les cotes extérieures (170 × 20 × 20 mm) sont telles que dans l'étuve Chopin grand modèle on puisse placer trois CM côte à côte, sans les superposer, afin d'assurer une conduction thermique directe entre le plancher de la case et le fond de la capsule.

f) Une calculatrice programmable (calculs satistiques).

2. *Mode opératoire.*

Le dosage de l'eau d'un échantillon de maïs par la méthode « grain par grain » consiste à effectuer les opérations suivantes, qui sont justifiées ultérieurement :

a) Homogénéiser l'échantillon par passage dans l'échantillonneur.

b) Prélever au hasard, dans le lot homogénéisé, un nombre de grains légèrement supérieur à celui nécessaire pour le dosage et les déposer dans un vase métallique muni d'un couvercle.

c) Prélever au hasard dans le vase métallique un premier grain (à l'aide d'une pince métallique); déposer le grain sur le plateau de la balance, le peser, puis le

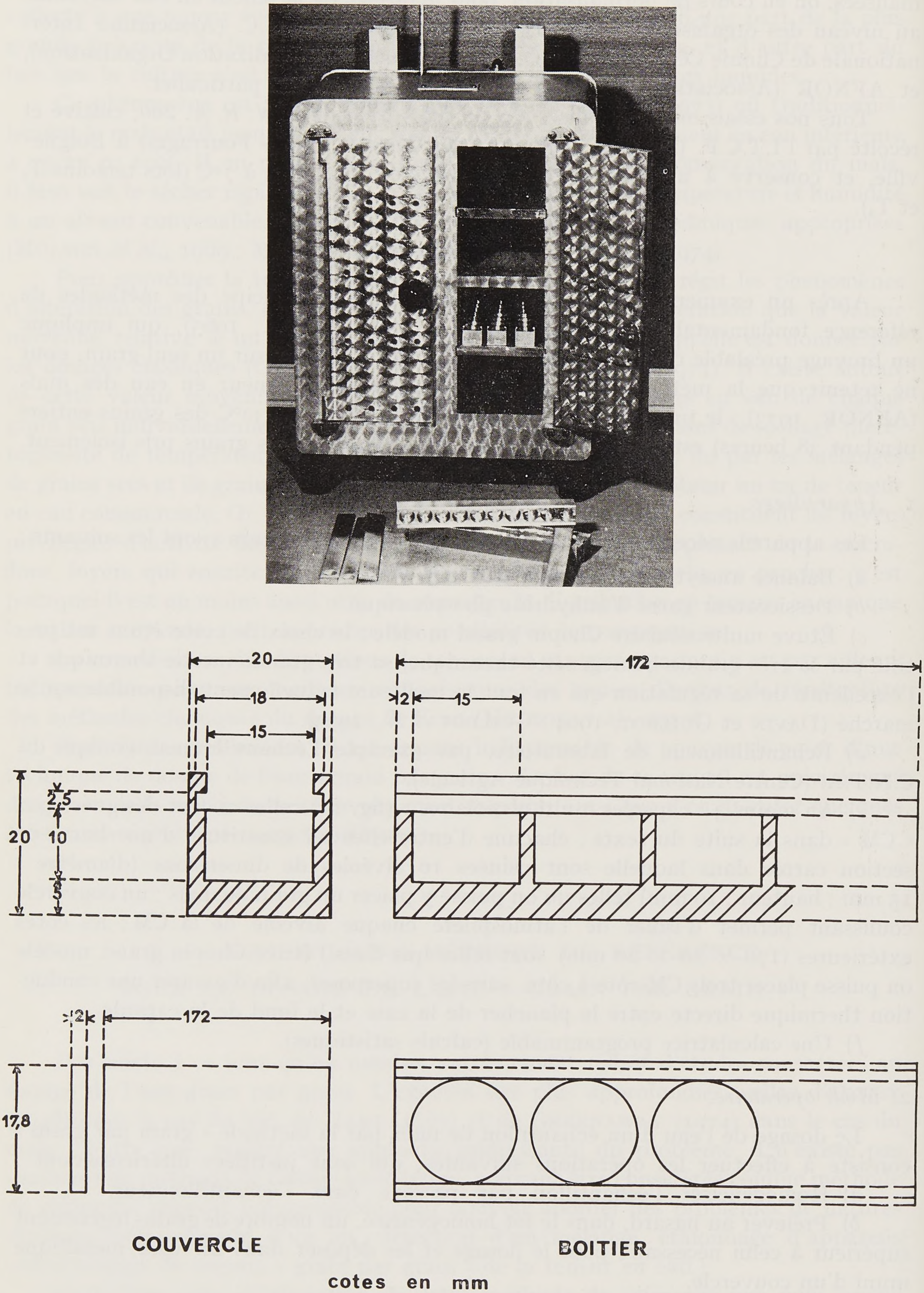


FIG. 1. — *Vue et schéma coté des capsules multi-alvéolaires utilisées dans la méthode de dosage de l'eau grain par grain*

placer dans la première alvéole de la première CM, et ainsi de suite jusqu'à ce que toutes les CM soient garnies.

d) Déposer les CM, couvercle retiré, dans les cases de l'étuve Chopin réglée à 130°C et les y laisser 39 heures.

e) Replacer les couvercles sur les CM, sortir celles-ci de l'étuve et les déposer dans un dessiccateur garni de P_2O_5, pendant le temps nécessaire à leur refroidissement jusqu'à la température ambiante (45 mn).

f) Sortir la première CM du dessiccateur (l'ordre d'entrée et de sortie des CM étant le même); faire coulisser le couvercle afin de dégager la première alvéole, déposer le grain sec sur le plateau de la balance et le peser; et ainsi de suite jusqu'au dernier grain;

g) Connaissant les poids humides et secs, calculer la teneur en eau de chaque grain, puis calculer la teneur en eau moyenne de l'échantillon (sur *n* grains) ainsi que les paramètres statistiques qui rendent compte de la dispersion des résultats, donc de l'homogénéité de l'échantillon (variance, écart-type, coefficient de variation, intervalle de confiance, histogramme de fréquence).

B. — *Étude critique de la méthode*

1. *Justification du choix du mode opératoire.*

La difficulté principale rencontrée dans l'étude des conditions opératoires réside dans l'absence d'éléments de comparaison ; les choix ont été faits essentiellement en cherchant le meilleur accord entre la moyenne des teneurs en eau, calculée sur *n* grains, et la teneur en eau donnée par les méthodes de référence classiques.

a) *Choix de l'effectif.*

Pour l'étude d'un échantillon, nous avons fixé à 30 le nombre minimal de grains à prélever. Ce choix tient compte de deux contraintes :

- d'une part, être du point de vue statistique dans le cas des grands échantillons, c'est-à-dire dans le cas où la distribution des moyennes suit avec certitude une loi gaussienne (Schwartz, 1972),
- d'autre part, ne pas rendre la durée totale des manipulations redhibitoire.

b) *Choix des récipients de dosage* (« Capsules multi-alvéolaires »).

La forme et les dimensions de la CM ont été choisies en fonction des cotes intérieures des cellules de l'étuve Chopin. Par ailleurs, les CM répondent aux impératifs suivants :

- être usinées dans un matériau non attaquable et excellent conducteur de la chaleur (aluminium) ;
- isoler les grains les uns des autres, afin d'éliminer toute possibilité d'inter action ;
- permettre la récupération quantitative du grain, même cassé ;
- être munies d'un couvercle suffisamment étanche, pour limiter le plus possible les échanges avec le milieu extérieur ; ceux-ci peuvent être en effet la source de deux erreurs : une erreur par défaut due à une perte d'eau des grains humides et une erreur par excès due à une reprise d'eau des grains déshydratés.

La figure 2 souligne la nécessité du couvercle, en montrant à quel point il permet de limiter ces échanges ; elle montre également l'importance qu'il y a à effectuer les manipulations le plus rapidement possible (en particulier les pesées pendant lesquelles le grain est en contact avec l'atmosphère).

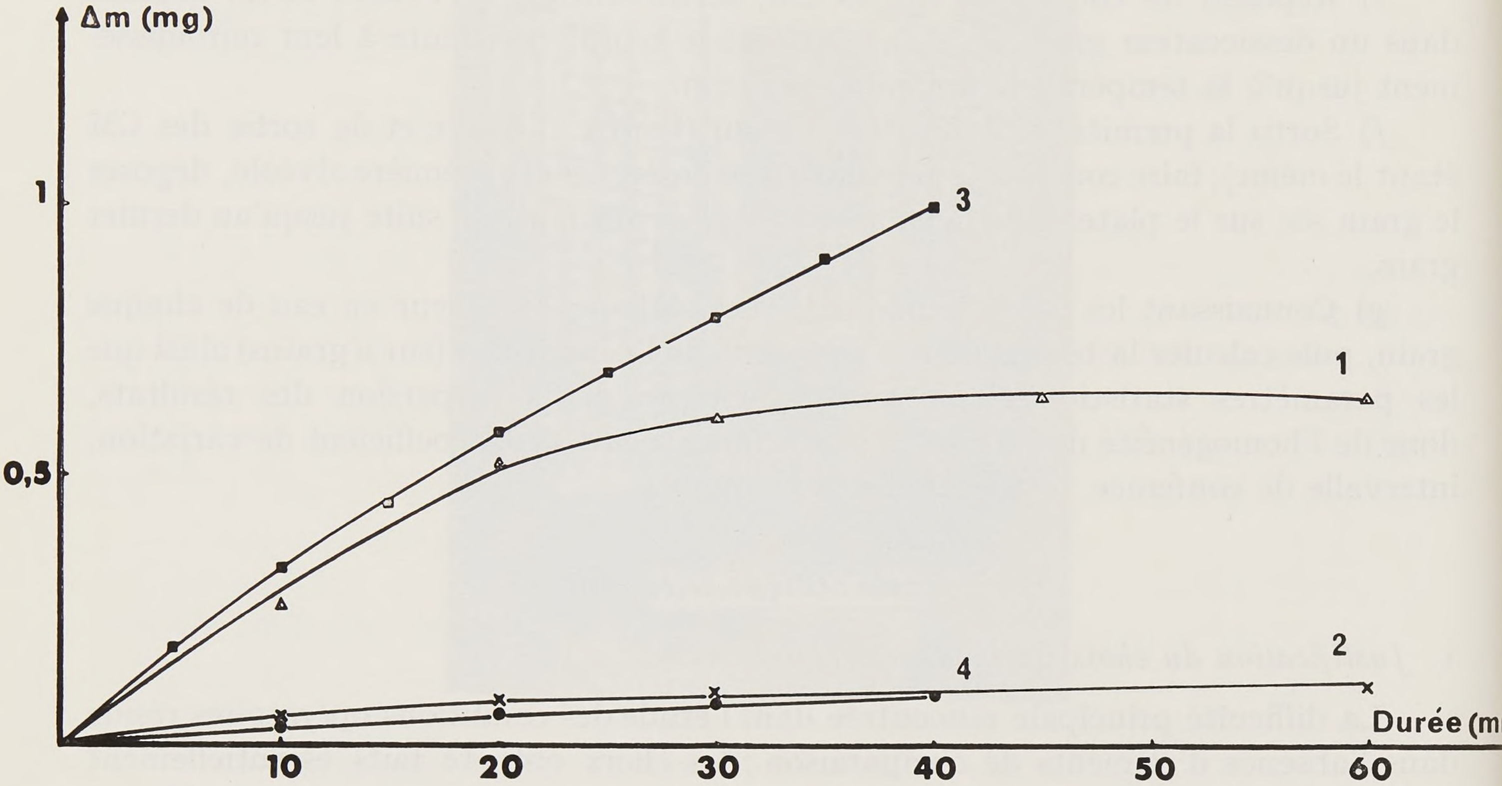


FIG. 2. — *Perte et reprise d'eau d'un grain isolé, en fonction du temps*
— reprise d'eau d'un grain déshydraté dans une capsule multi-alvéolaire
sans couvercle : 1
avec couvercle : 2
— perte d'eau d'un grain humide dans une capsule multi-alvéolaire
sans couvercle : 3
avec couvercle : 4

c) *Choix de la température et de la durée d'étuvage.*

Le choix de la température d'étuvage a été effectué en fonction de l'expérience préalable que l'on avait des dosages d'eau classiques (référence pratique I.C.C. nº 109 et 110, et appréciation sur le maïs AFNOR NF-V-03-708). Dans les deux cas, les mêmes raisons ont conduit à fixer la température à 130 ± 2ºC ; rappelons en effet que les méthodes d'étuvage sont en fait des méthodes étalonnées par rapport à la méthode de référence fondamentale et qui ne donnent un résultat exact que par compensation des erreurs : d'une part, erreurs par défaut dues à une petite quantité d'eau non extraite et aux phénomènes d'oxydation, d'autre part erreurs par excès dues aux pertes de matières organiques, acides gras en particulier. C'est à 130ºC que cette compensation semble être la meilleure pour des durées d'étuvage raisonnables (GUILBOT *et al.*, 1973).

Ceci est confirmé dans le cas du dosage « grain par grain » par le fait qu'à cette température les coefficients de variation (calculés sur 30 grains) sont les plus faibles et que, par conséquent, la précision des résultats est la meilleure (tabl. 1).

Par ailleurs, il était intéressant de choisir la même température que celle retenue au niveau international pour les autres méthodes, ne serait-ce que pour éviter des réglages différents des étuves.

Il restait alors à étalonner la méthode en fixant la durée d'étuvage par comparaison à la méthode de référence fondamentale. Le tableau 2 et la figure 3 résument les divers essais effectués à ce sujet.

TABLEAU 1

Coefficients de variation (p. 100)
des mesures de teneurs en eau effectuées sur 30 grains, en fonction de la teneur en eau et du type d'étuvage

Dosage « grain par grain » Type d'étuvage	Teneur en eau (p. 100 SH) déterminée par la méthode de référence fondamentale		
	13,04	21,06	29,95
102°C — 72 heures	3,05	3,60	4,59
130°C — 39 heures	2,47	2,17	3,03
160°C — 6 heures	2,40	3,46	3,63

TABLEAU 2

Comparaison des résultats de dosages d'eau obtenus par deux méthodes classiques et par la méthode « grain par grain » (moyennes de 30 grains) *à 130°C, en fonction de la durée d'étuvage*

Dosage « grain par grain », à 130°C				Méthode de référence fondamentale	Méthode pratique d'appréciation 130°C — 38 heures
Durée étuvage (heures)	32	39	44		
Teneur en eau (p. 100 SH)	13,68	13,30	12,84	13,04	12,96
	16,51	16,32	16,26	16,40	16,50
	20,77	21,17	20,87	21,06	21,24
	30,61	30,00	30,17	29,95	30,35

La figure 3 montre qu'en fonction de la durée d'étuvage la teneur en eau moyenne « grain par grain » évolue en passant par un maximum très voisin du résultat donné par la méthode de référence fondamentale, aux environs de 38-39 heures.

Le tableau 2 confirme ce résultat ; en outre, une analyse de variance en blocs casualisés effectuée sur les données de ce tableau montre que, au seuil de 5 p. 100, les écarts observés entre 32, 39 et 44 heures ne sont pas significatifs.

Ces diverses considérations nous ont donc amenés à fixer la durée d'étuvage à 38-39 heures, comme c'est le cas dans la méthode pratique d'appréciation (AFNOR, 1973).

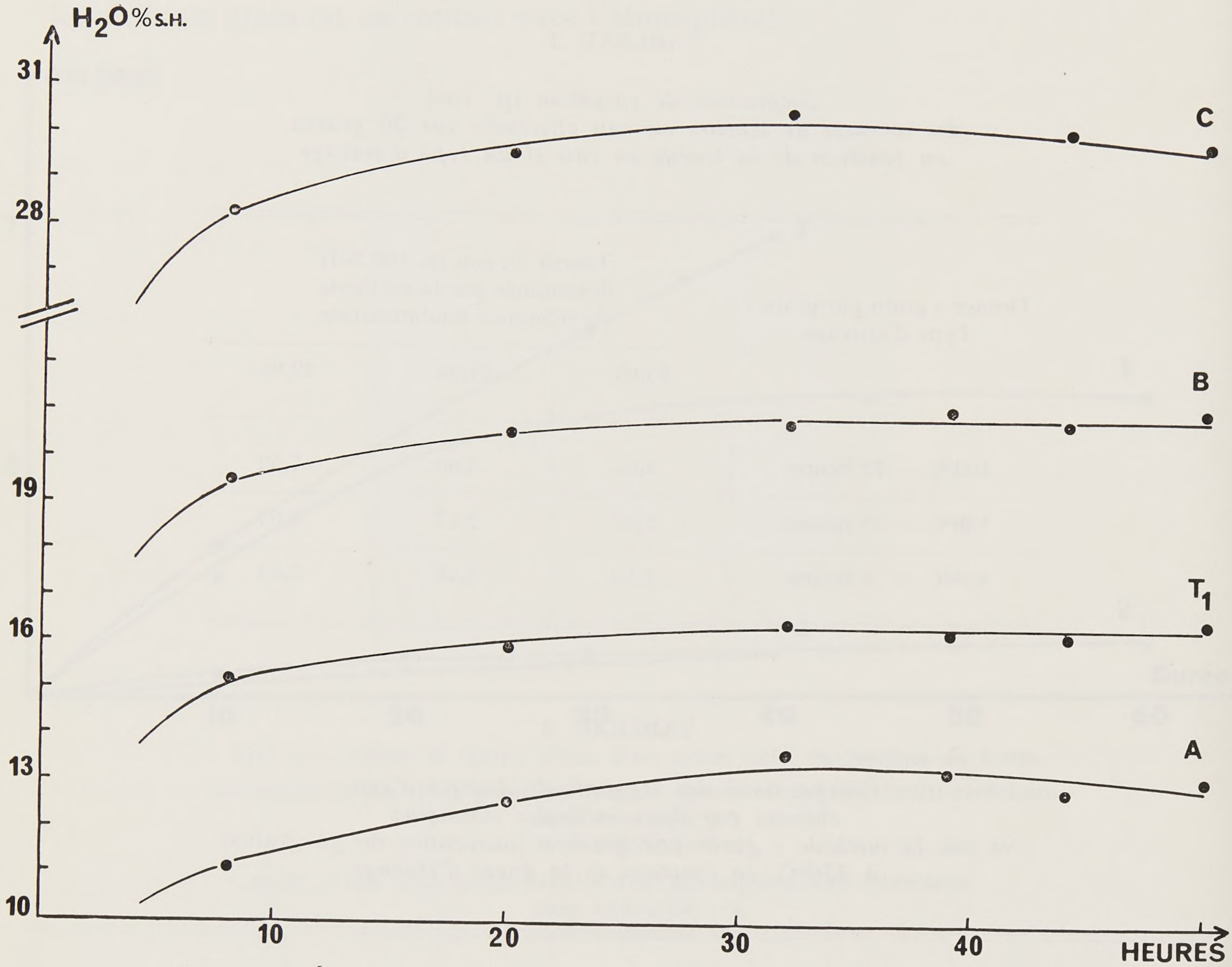


FIG. 3. — *Évolution de la teneur en eau moyenne de 4 échantillons de maïs, en fonction de la durée d'étuvage à 130°C*

2. *Étude de la précision et de la répétabilité de la méthode.*

L'erreur commise sur l'évaluation de la teneur en eau d'un grain (répétabilité de la mesure) ne peut pas être appréciée expérimentalement : en effet, d'une part la mesure sur un grain est destructive et ne peut donc être répétée, l'étuvage modifiant les caractéristiques du grain en raison du choc thermique, d'autre part les répétitions sur des grains différents intègrent l'erreur de mesure sur chaque grain et la fluctuation d'échantillonnage entre grains (dont la connaissance est précisément le but de la méthode).

Il est cependant possible d'apprécier l'erreur instrumentale par le calcul de l'erreur relative commise sur la teneur en eau d'un grain. Ce calcul peut être fait par la méthode des différentielles logarithmiques à partir de la formule définissant la teneur en eau par rapport à la matière humide :

$$X = \frac{H - S}{H} \qquad (1)$$

H désignant le poids humide et S le poids sec d'un grain.

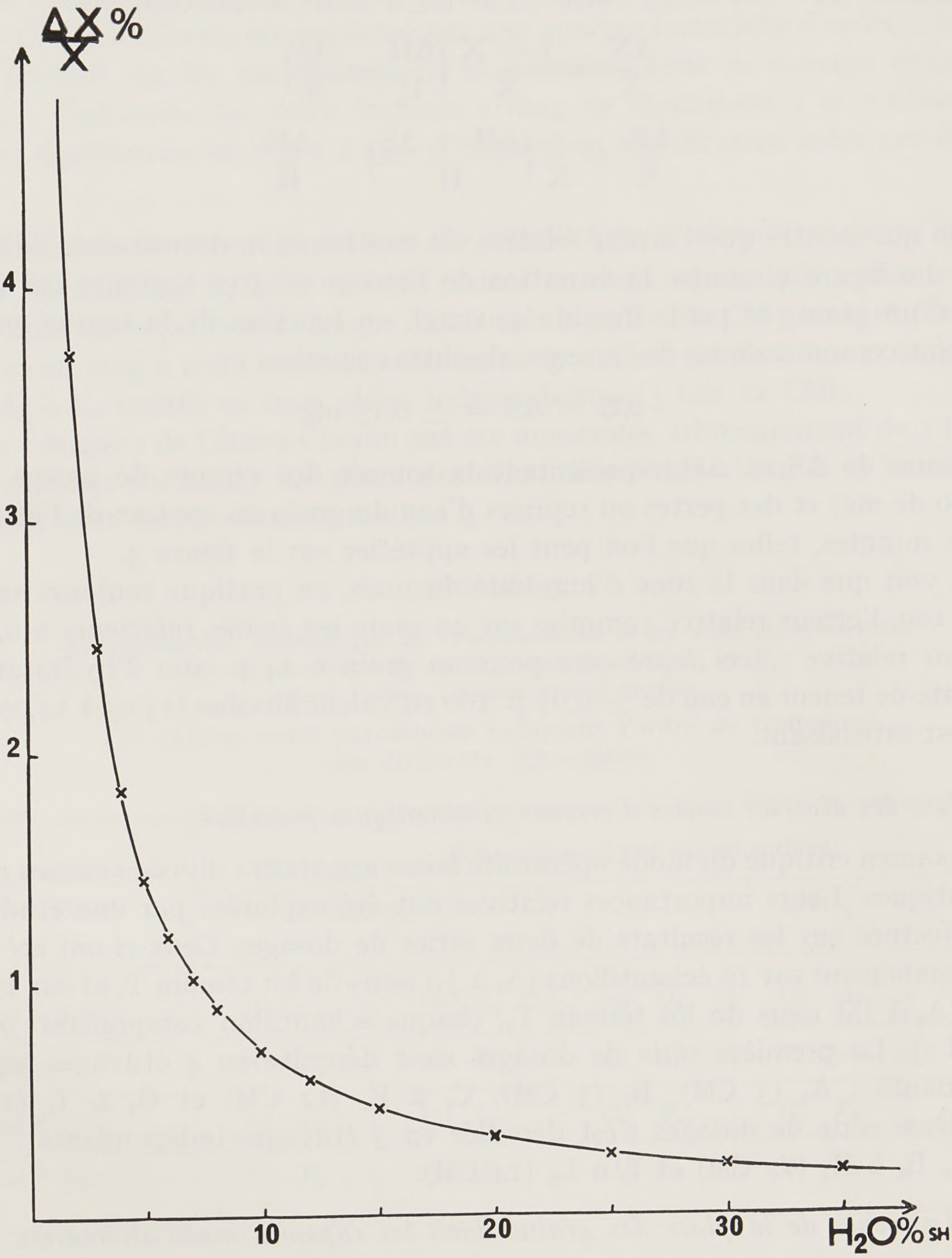


FIG. 4. — *Variations de l'erreur relative commise sur l'évaluation de la teneur en eau d'un grain, en fonction de la teneur en eau de celui-ci*

$$\text{Log } X = \text{Log}(H - S) - \text{Log } H$$

$$\frac{dX}{X} = \frac{d(H - S)}{H - S} - \frac{dH}{H} = \frac{S\, dH - H\, dS}{(H - S)\, H}$$

D'où, en passant aux variations finies, l'expression de l'erreur relative maximale :

$$\frac{\Delta X}{X} = \frac{S}{H - S}\left(\frac{\Delta H}{H} + \frac{\Delta S}{S}\right) \qquad (2)$$

En éliminant (H — S) et (S) entre (1) et (2) il vient successivement :

$$\frac{\Delta X}{X} = \frac{1 - X}{X}\left(\frac{\Delta H}{H} + \frac{\Delta S}{S}\right) \qquad (3)$$

$$\frac{\Delta X}{X} = \frac{1}{X}\left(\frac{\Delta H + \Delta S}{H}\right) - \frac{\Delta H}{H} \qquad (4)$$

équation qui montre que l'erreur relative est une fonction décroissante de la teneur en eau. La figure 4 montre la variation de l'erreur relative commise sur la teneur en eau d'un grain (de poids humide 400 mg), en fonction de la teneur en eau, en admettant comme valeurs des erreurs absolues commises :

$$\Delta H = \Delta S = \pm\ 0{,}15 \text{ mg.}$$

Ces valeurs de ΔS et ΔH représentent la somme des erreurs de pesées (balance au 1/100 de mg) et des pertes ou reprises d'eau du grain au contact de l'atmosphère en deux minutes, telles que l'on peut les apprécier sur la figure 3.

On voit que dans la zone d'humidité du maïs, en pratique toujours supérieure à 14 p. 100, l'erreur relative commise sur un grain est faible, inférieure à 0,5 p. 100 en valeur relative : ceci représente pour un grain à 14 p. 100 d'hydratation une fourchette de teneur en eau de ± 0,07 p. 100 en valeur absolue (13,93 à 14,07 p. 100), ce qui est satisfaisant.

3. *Analyse des diverses causes d'erreurs systématiques possibles.*

L'examen critique du mode opératoire laisse apparaître diverses causes d'erreurs systématiques. Leurs importances relatives ont été explorées par une étude statistique effectuée sur les résultats de deux séries de dosages. Ceux-ci ont été obtenus extemporanément sur 10 échantillons (A_1 à J_1) issus du lot témoin T_1 et sur 12 échantillons (A_2 à L_2) issus du lot témoin T_2, chaque échantillon comprenant 30 grains (3 « CM »). La première série de dosages s'est déroulée en 4 étuvages séparés et indépendants : A_1 (3 CM), B_1 (3 CM), C_1 à F_1 (12 CM) et G_1 à J_1 (12 CM) ; la deuxième série de dosages s'est déroulée en 3 étuvages indépendants : A_2 à D_2 (12 CM), E_2 à H_2 (12 CM) et I_2 à L_2 (12 CM).

a) *Influence de la place des grains dans les capsules multi-alvéolaires.*

Nous avons examiné l'influence éventuelle du rang de traitement des grains dans une CM (entre la première et la dixième alvéole) sur la teneur en eau mesurée. En effet, lorsque la CM est sortie du dessiccateur pour effectuer la pesée du grain déshydraté, il pourrait se produire une légère reprise d'eau allant en augmentant du premier au dixième grain, encore que la reprise d'eau d'un grain dans une CM munie de son couvercle soit très faible (fig. 3) ; en outre, la disposition des CM dans l'étuve (fig. 1) pourrait conduire à un séchage légèrement différent des grains selon qu'ils se trouvent placés vers l'avant ou vers l'arrière de l'étuve. L'étude de régression linéaire effectuée sur ordinateur IBM 360, entre le rang des grains (de 1 à 10 dans chaque CM) et les teneurs en eau de 240 grains (échantillons C_1 à J_1) a conduit à l'équation de régression suivante :

rang de traitement $= 134 \cdot 10^{-5} H_2O$ p. 100 $+ 5{,}479$ avec un coefficient de corrélation $r = 0{,}11 \cdot 10^{-5}$ (non significatif).

Il en résulte qu'il n'y a aucune influence décelable de la place des grains dans une CM. Ceci a d'ailleurs été confirmé par une analyse factorielle d'ordre 2 (à 3 répétitions) portant sur les 360 données de la deuxième série de dosages (échantillons A_2 à L_2) : l'influence des deux facteurs « rang de traitement » et « échantillon » n'est pas significative et il n'y a pas d'interaction significative entre ces deux facteurs.

b) *Ordre de traitement et position des capsules multi-alvéolaires dans l'étuve.*

Les échantillons C_1 à J_1 ont été traités en deux séries indépendantes (2 fois 12 CM) mais en respectant à chaque fois le même ordre : la CM garnie et placée dans une étuve au rang *n* a été sortie et vidée au rang *n* ; il en est de même pour les échantillons A_2 à L_2 traités en trois séries indépendantes (3 fois 12 CM).

Les « étages » de l'étuve Chopin ont été numérotés arbitrairement de 1 (étage du bas) à 4 (étage du haut). La place des échantillons dans l'étuve et leur ordre de traitement sont décrits dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Représentation schématique de l'emplacement et du rang de traitement des échantillons de maïs, issus des lots T_1 et T_2, dans l'étuve Chopin grand modèle

Les chiffres entre parenthèses indiquent l'ordre de traitement des différents échantillons

Place des CM dans l'étuve	Échantillons (3 CM par échantillon)				
	Lot T_1		Lot T_2		
case 4 (haut)	(1) C_1	(1) G_1	(4) D_2	(4) H_2	(4) L_2
case 3	(2) D_1	(2) H_1	(3) C_2	(3) G_2	(3) K_2
case 2	(3) E_1	(3) I_1	(2) B_2	(2) F_2	(2) J_2
case 1 (bas)	(4) F_1	(4) J_1	(1) A_2	(1) E_2	(1) I_2

La figure 5 montre la régression hautement significative qui a été observée entre le numéro de l'étage de l'étuve Chopin et la teneur en eau moyenne de chaque CM (moyenne sur 10 grains), les coefficients de corrélation étant respectivement de 0,818 et 0,608 pour la première et la deuxième série.

L'ordre d'entrée et de sortie des CM dans l'étuve a été inversé entre les deux séries (tabl. 3), l'étuve ayant été remplie en commençant par l'étage du haut pour la première série, et par l'étage du bas pour la deuxième série.

La régression observée est donc liée à l'emplacement des CM dans l'étuve, et non à l'ordre d'entrée et de sortie des CM.

Nous avons d'ailleurs retrouvé un effet similaire (bien que d'amplitude moindre) dans le cas d'un dosage d'eau classique sur grains entiers (AFNOR, 1973), comme le montrent les résultats suivants, obtenus sur le lot T_2 (chaque résultat est une moyenne de 6 mesures correspondant à 6 capsules Chopin) :

Nº de l'étage	1	2	3	4
Teneur en eau (p. 100) moyenne de 6 échantillons	15,34	15,30	15,27	15,21

Bien qu'aucun gradient de température ni de pression (traduisant des différences d'écoulement d'air) n'aient pu être mis en évidence, il est probable que ce phénomène soit dû à des différences très minimes de ventilation (« effet de cheminée »).

L'ordre de grandeur de l'incertitude ainsi introduite demeure très faible et négli-

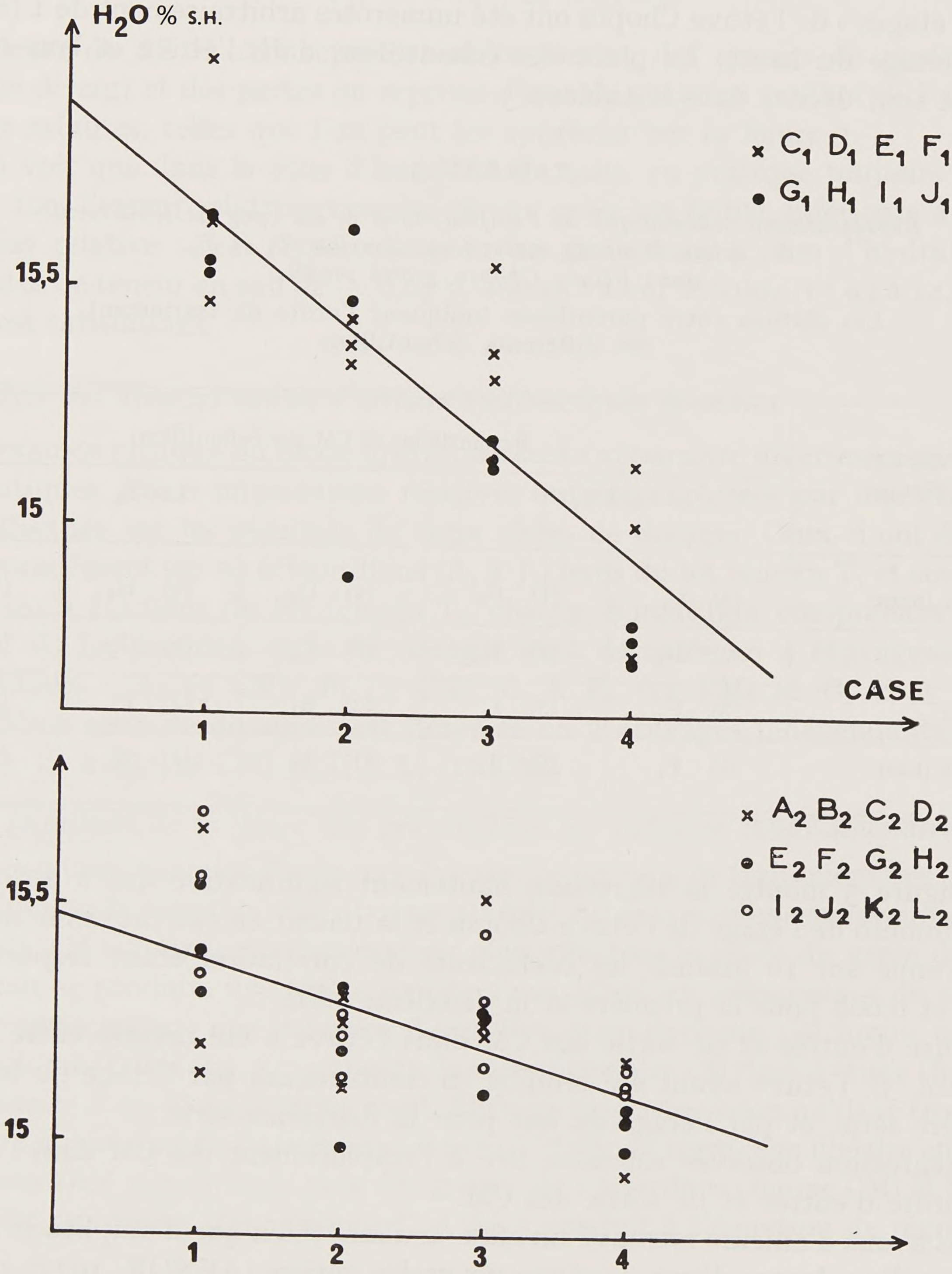


Fig. 5. — *Corrélation entre la teneur en eau moyenne des capsules multi-alvéolaires et leur place dans l'étuve*

Échantillons issus du lot T_1 (en haut) ; échantillons issus du lot T_2 (en bas)

geable puisque, d'une part, les valeurs des teneurs en eau moyennes (par CM) restent dans les limites de l'intervalle de confiance de la moyenne calculé sur 10 grains : $m \pm 0,45$ p. 100 pour la première série de dosages et $m \pm 0,35$ p. 100 pour la deuxième série de dosages ; d'autre part la place des CM est sans effet sur la dispersion des résultats relatifs à cette CM car il n'y a pas de liaison significative entre le coefficient de variation, calculé pour les 10 grains d'une CM, et la place de celle-ci dans l'étuve.

Quoi qu'il en soit, on peut limiter cette influence en utilisant, chaque fois que cela est possible, les mêmes cases de l'étuve pour des échantillons dont les résultats sont destinés à être comparés.

c) *Étude de l'effet du poids des grains.*

Nous avons vérifié qu'il n'existe pas de liaison significative entre la teneur en eau et, d'une part les poids secs, d'autre part les poids humides des grains.

Une telle corrélation aurait pu être due, soit à une propriété intrinsèque des grains (les plus volumineux absorbant, par exemple, un peu plus d'eau que les plus petits), soit à un effet de la dimension des grains sur les erreurs de pesées et de reprise d'eau. Les corrélations calculées sur IBM 360, à partir de 300 données provenant des échantillons A_1 à J_1, sont :

α) dans le cas du poids sec : $y = 0,48 \cdot 10^{-5}\, x + 15,15$
$$r = 0,75 \cdot 10^{-4}$$
avec y : teneur en eau en p. 100 SH et x : poids sec en mg.

β) dans le cas du poids humide : $y = 0,35 \cdot 10^{-4}\, x + 15,24$
$$r = 0,52 \cdot 10^{-2}$$
avec y : teneur en eau et x : poids humide.

Les coefficients de corrélation étant très éloignés des seuils de signification, on peut donc considérer qu'il y a indépendance complète entre les poids, humides ou secs, et les teneurs en eau des grains.

II. — CARACTÉRISTIQUES GÉNÉRALES DE LA DISTRIBUTION DES TENEURS EN EAU DANS UN LOT DE MAÏS STABILISÉ (FLUCTUATIONS D'ÉCHANTILLONNAGE)

Connaissant les causes d'erreurs de la méthode et sa précision, il est intéressant d'apprécier les variations de teneurs en eau dues aux fluctuations d'échantillonnage. A cet effet, nous avons repris les résultats des deux séries de dosages portant sur les lots T_1 et T_2, la première représentant une population globale de 300 grains (10×30), la seconde une population de 360 grains (12×30).

A. — *Résultats obtenus*

Les résultats des 298 dosages d'eau (2 grains cassés ayant été éliminés) du lot T_1 ont été répartis en 18 classes, avec un intervalle de classe de 0,2 p. 100 ; ceux des 360 dosages d'eau du lot T_2 ont été répartis en 13 classes, avec un intervalle

de 0,2 p. 100 : les histogrammes de la figure 6 traduisent la distribution de fréquence de ces populations. La représentation linéaire obtenue en portant les effectifs de classe en pourcentage cumulé relatif, en fonction des limites supérieures de classe, sur un diagramme de probabilité (fig. 7) montre que la distribution des teneurs en eau dans un lot de maïs est du type de Gauss ; ceci nous autorise donc à utiliser les tests statistiques de comparaison qui sont établis sur ce modèle mathématique.

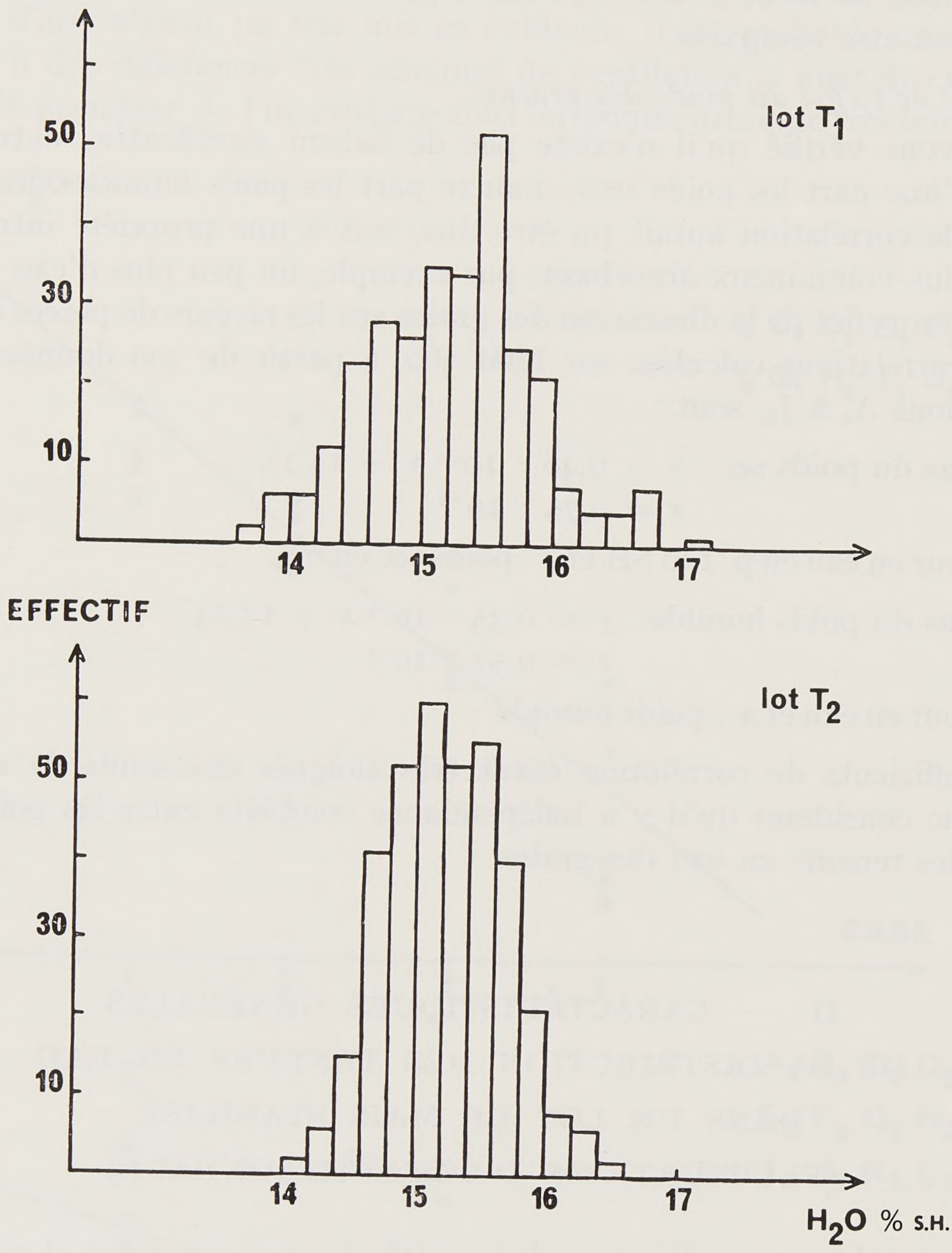


FIG. 6. — *Distribution de fréquence des teneurs en eau des lots T_1 et T_2*
— lot T_1 : effectif total 298 grains
— lot T_2 : effectif total 360 grains

En particulier, nous pouvons définir sans ambiguïté, en appliquant la relation classique : $m \pm t \cdot S/\sqrt{n}$, les intervalles de confiance suivants (au risque de 5 p. 100) :

(*a* Intervalle de confiance de la moyenne (30 grains) :

lot T_1 : 15,25 ± 0,23 p. 100 SH (S = 0,63 p. 100 SH)
lot T_2 : 15,25 ± 0,16 p. 100 SH (S = 0,45 p. 100 SH)

b) Intervalle de confiance d'une valeur individuelle (un grain au hasard) :

lot T_1 : 15,25 ± 1,26 p. 100 SH
lot T_2 : 15,25 ± 0,90 p. 100 SH

L'intervalle de confiance d'une valeur isolée (2 à 2,5 p. 100 environ) traduit la dispersion quasi inévitable que l'on observe d'un grain à un autre dans un lot de maïs stabilisé par un repos de quelques jours dans un flacon.

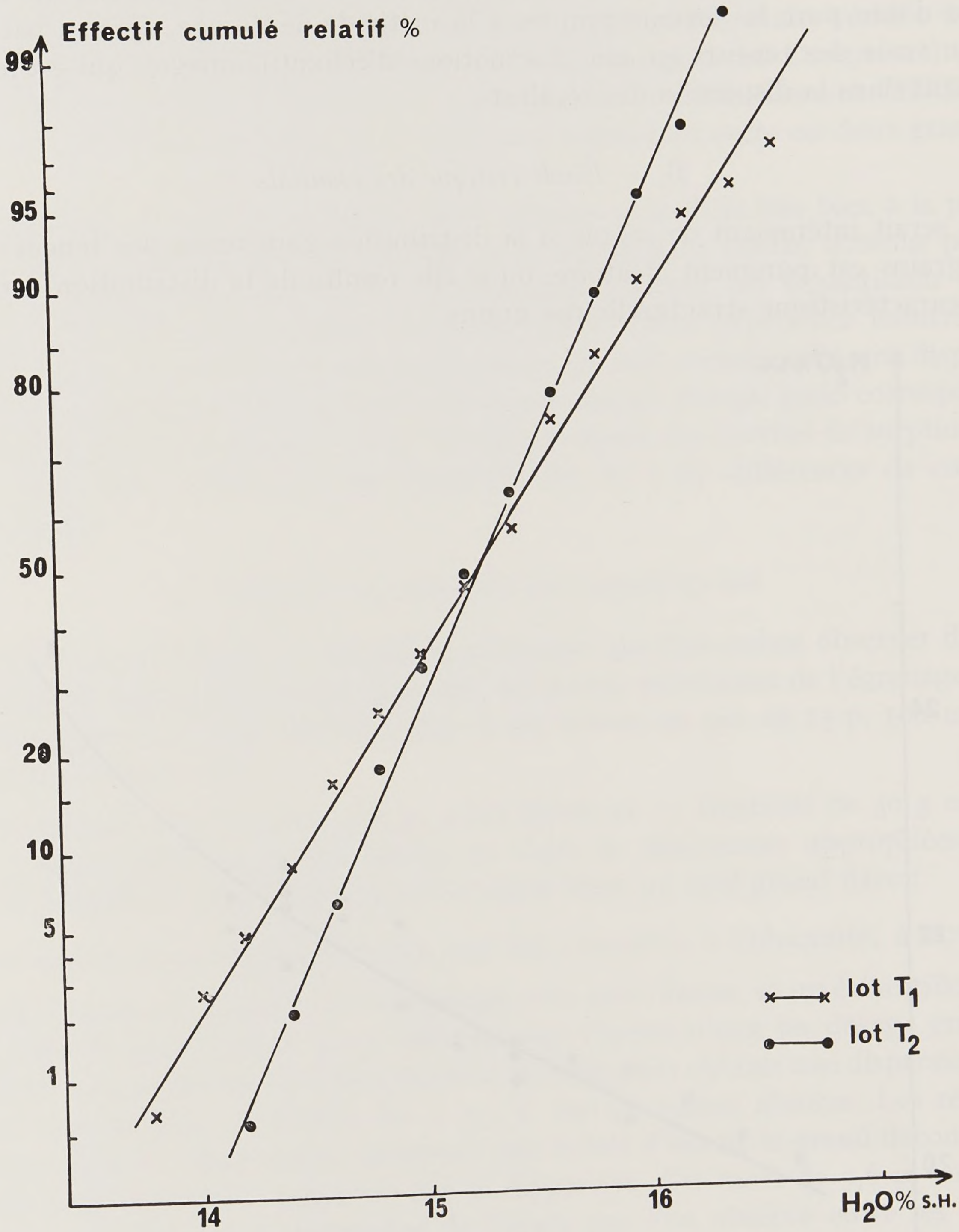


Fig. 7. — *Distribution de fréquence des teneurs en eau des lots T_1 et T_2*
Tests de normalité

De même, l'examen du coefficient de variation, rapport sans dimension de la moyenne à l'écart-type, permet de dire que, pour un dosage portant sur 30 grains, on a 95 p. 100 de chances de trouver un coefficient de variation compris entre 2 et 5 p. 100, avec un maximum de probabilité aux environs de 3,5 p. 100.

Des échantillons présentant des valeurs très différentes de celles-ci risquent d'avoir subi certains traitements modifiant la répartition de l'eau entre les grains.

L'étude de la corrélation entre le coefficient de variation et la teneur en eau moyenne d'un échantillon montre qu'il n'y a pas de liaison entre la dispersion des teneurs en eau (coefficient de variation) et le niveau de teneur en eau considéré. Ceci n'est pas contradictoire avec le calcul d'erreur qui indiquait une erreur relative fonction inverse de la teneur en eau (fig. 4) : en effet, le coefficient de variation intègre d'une part les erreurs propres à la méthode de dosage, d'autre part la dispersion vraie des teneurs en eau (fluctuations d'échantillonnage), qui est le facteur dominant dans la dispersion des résultats.

B. — *Étude critique des résultats*

Il serait intéressant de savoir si la distribution gaussienne des teneurs en eau entre grains est purement aléatoire, ou si elle résulte de la distribution corrélative d'une caractéristique structurelle des grains.

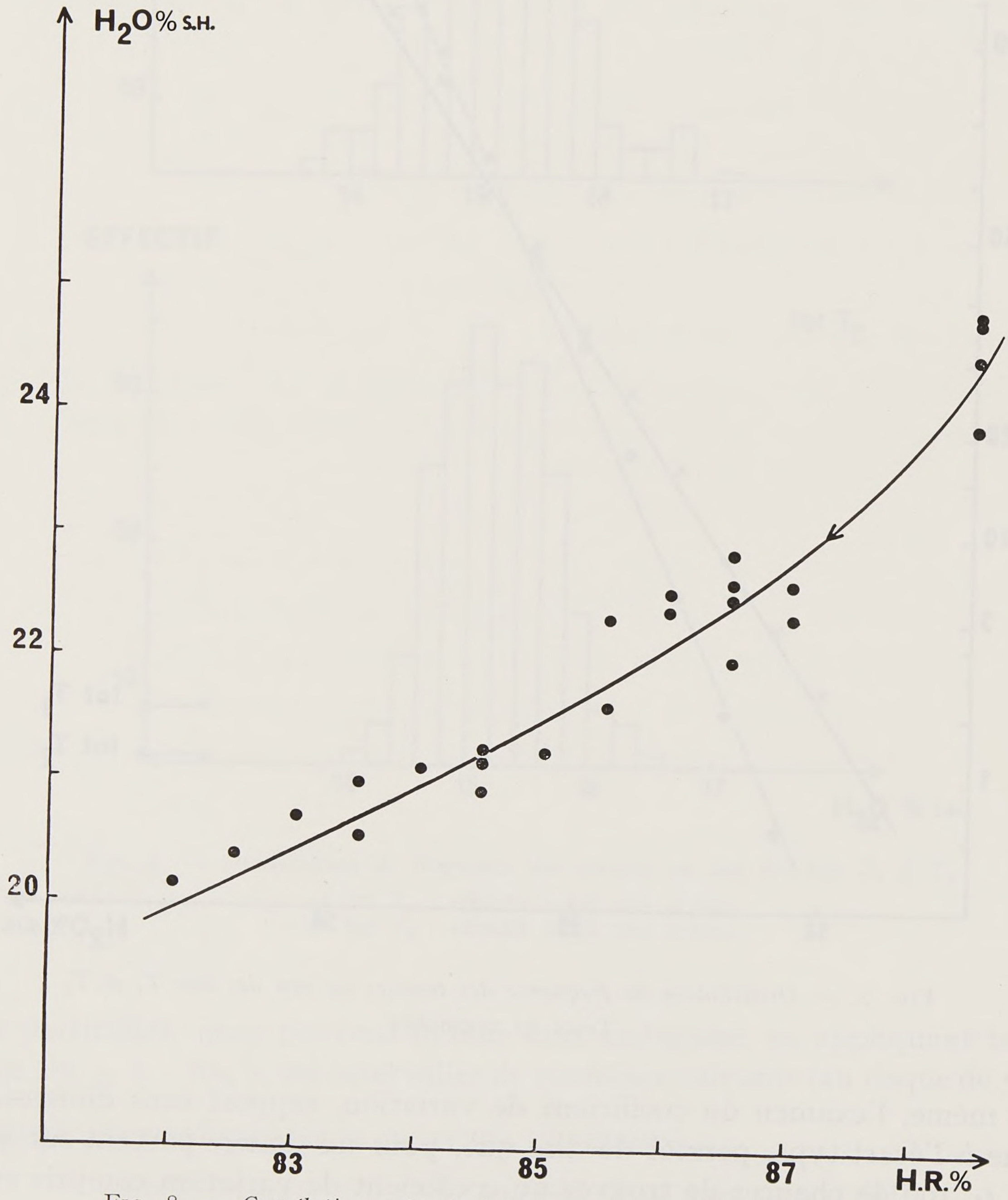


FIG. 8. — *Corrélation entre la teneur en eau et l'humidité relative, mesurée avec l'hygromètre « L.C.I.E.-Richard », grain par grain* (23°C)

Ayant déjà vérifié (cf. I, B, 3, c) l'indépendance vis-à-vis du poids sec et du poids humide des grains, nous avons voulu examiner s'il y a indépendance ou non des humidités relatives d'équilibre (HRE) des grains.

Dans ce but, nous avons utilisé un hygromètre très sensible, dont la sonde de mesure capacitive, de très petite dimension, peut contenir un seul grain. L'appareil utilisé est un prototype prêté par les Éts J. RICHARD, et dont la sonde a été étalonnée par nos soins dans une étuve Chopin spécialement modifiée par l'adaptation d'un dispositif de régulation hygrométrique (MULTON, 1967), l'HR étant vérifiée à l'aide d'un hygromètre électronique à point de rosée (Compagnie des Compteurs). Grâce à ce dispositif, nous avons pu montrer en mesurant individuellement l'HRE, puis la teneur en eau de chaque grain, qu'il existe une corrélation entre ces deux grandeurs (fig. 8).

Par ailleurs, la portion de courbe ainsi obtenue s'identifie très bien à la portion correspondante d'une courbe de désorption du même maïs, courbe obtenue par une technique habituelle du laboratoire, et consistant à laisser des échantillons s'équilibrer avec des HR décroissantes (MULTON, 1967). Cette expérience montre donc que la dispersion des teneurs en eau entre grains de maïs correspond à une dispersion équivalente des pressions de vapeur émises par les grains, chaque grain correspondant à la même courbe de sorption et non à des grains ayant des courbes de sorption légèrement différentes, phénomène qui aurait pu être dû à des différences de composition chimique.

C. — *Dispersion minimale des teneurs en eau*

Dans le but d'évaluer la dispersion minimale que l'on puisse observer dans un échantillon de maïs parfaitement stabilisé, des grains provenant de l'égrenage d'épis de maïs conservés en crib ont été séchés à une teneur en eau de 15 p. 100 environ, puis répartis en deux lots :

- le premier, soit environ 450 g, a été divisé en 15 fractions de 30 g environ, et placé dans des petits flacons en verre de dimensions appropriées ;
- le deuxième, environ 500 g, a été placé dans un seul grand flacon.

Ces flacons hermétiquement clos, ont été conservés à l'obscurité, à 20°C.

Périodiquement on prélevait le contenu d'un petit flacon, et un échantillon équivalent dans le grand flacon, pour effectuer sur chacun d'eux un dosage grain par grain. Dans ces conditions, il a fallu environ un mois pour obtenir une dispersion minimale ne variant plus, de l'ordre de ± 0,3 p. 100 en valeur absolue. Les résultats, identiques dans les deux essais, montrent que le fait d'ouvrir le grand flacon pour y faire des prélèvements n'augmente pas la dispersion. Cet écart de 0,6 p. 100 entre les grains extrêmes est à rapprocher de l'écart que l'on observe entre les courbes de sorption et de désorption (hystérésis) qui est de l'ordre (dans le cas du maïs) de 0,8 p. 100 environ pour des humidités moyennes.

Quoi qu'il en soit, ces quelques expériences permettent une interprétation assez précise de la distribution des teneurs en eau dans un échantillon de maïs tout venant. La dispersion des teneurs en eau peut s'expliquer par la superposition de deux phénomènes :

- d'une part, une dispersion minimale et quasi irréductible (0,6 p. 100 environ)

sans doute due au fait que certains grains se trouvent en désorption et d'autres en sorption (hystérésis) ;

• d'autre part, une dispersion surajoutée (2 p. 100 environ) due à des pressions partielles de vapeur d'eau différentes entre les grains (HRE différentes), mais tendant à s'équilibrer très lentement.

III. — EXEMPLES D'APPLICATION DE LA MÉTHODE

La méthode de dosage « grain par grain » peut être mise en œuvre utilement pour étudier et résoudre divers problèmes qui se posent en pratique. Nous en relatons ci-dessous trois exemples particulièrement significatifs.

A. — *Humidification d'échantillons de maïs*

Certaines opérations de laboratoire (préparation d'échantillons d'humidités connues pour l'étalonnage d'humidimètres ou pour des essais de conservation) ou industrielles (conditionnement avant mouture) nécessitent une humidification préalable. Lorsque celle-ci est réalisée par addition directe de la quantité adéquate d'eau liquide, il est intéressant de connaître avec précision le temps nécessaire pour que la répartition de l'eau entre les grains soit homogène.

Dans ce but, nous avons suivi l'évolution de la teneur en eau « grain par grain » de différents lots de maïs préalablement humidifiés (à partir des lots T_1 et T_2), avec ou sans agitation pendant la période d'homogénéisation.

Les résultats en sont résumés dans le tableau 4 et, à titre d'exemple, la figure 9 présente l'allure des courbes obtenues dans le cas d'une part de l'évolution de la teneur en eau moyenne et de son intervalle de confiance, et d'autre part de l'évolu-

TABLEAU 4

Résultats obtenus quant à la durée d'homogénéisation de la teneur en eau (moyenne et coefficient de variation) *de différents lots de maïs humidifiés, selon le mode d'homogénéisation* (avec ou sans agitation)

	Lots	Teneur en eau (p. 100 SH)	Durée d'homogénéisation (jours)	Coefficient de variation (p. 100)	Durée d'homogénéisation (jours)
Avec agitation périodique	B	22,5	1	2,6	6
	C	33,5	3	3,5	9
	D_1	28,3	3	3,3	5
	E	34,5	3	3,4	8
Sans agitation	D_2	28,4	3	3	6
	F	34,5	3	4	8

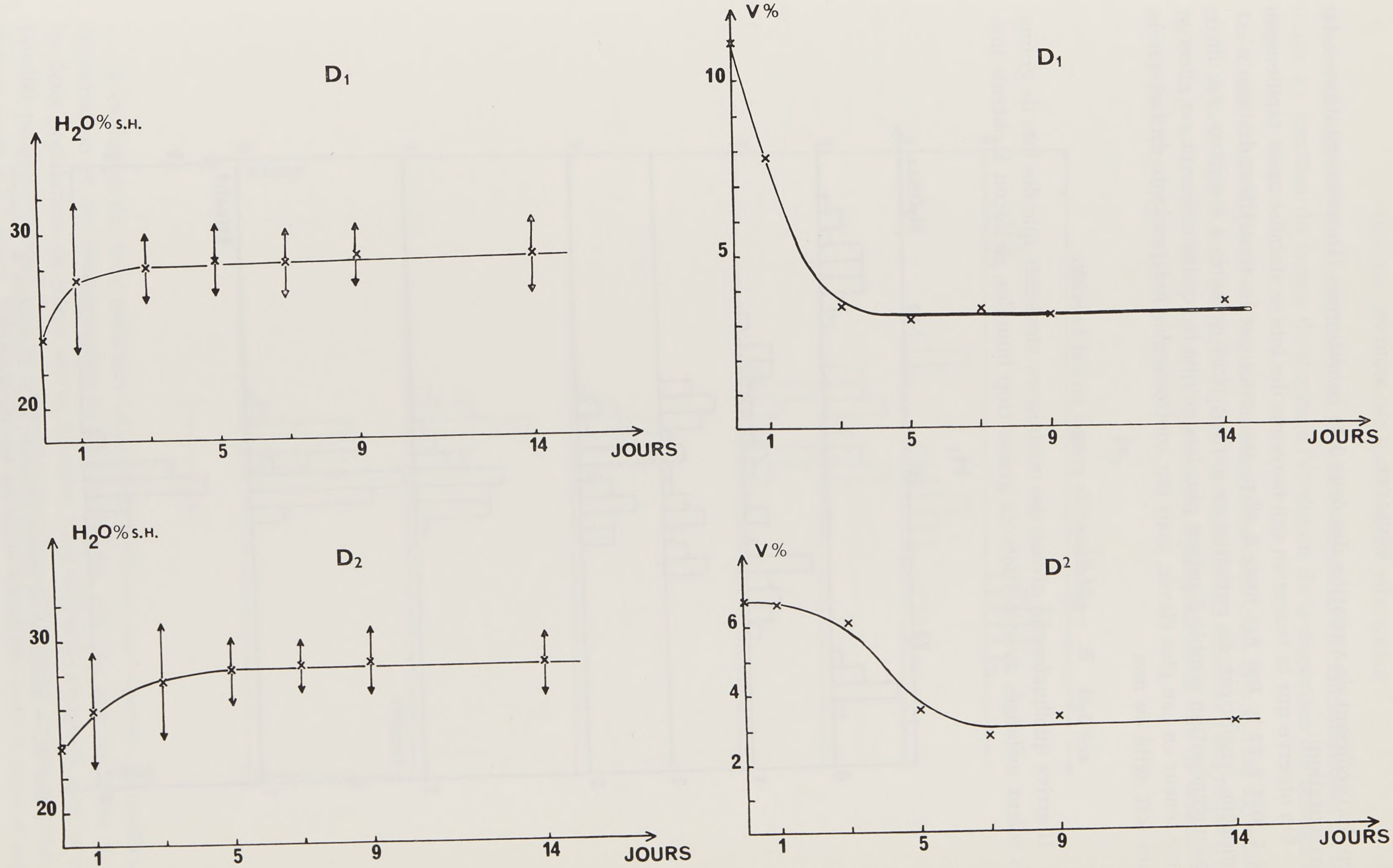


FIG. 9. — *Évolution, en fonction du temps, de la teneur en eau moyenne, de l'intervalle de confiance de sa mesure et du coefficient de variation de la teneur en eau des lots D_1 et D_2*

tion du coefficient de variation des deux lots conditionnés (D_1 avec agitation et D_2 sans agitation).

On observe que la teneur en eau moyenne des lots se stabilise assez rapidement (de 1 jour à 22 p. 100 à 3 jours à 28 p. 100) mais que la répartition de l'eau n'est homogène (coefficient de variation ne variant plus) qu'après 5 à 9 jours. La durée d'homogénéisation semble d'autant plus longue que le conditionnement est effectué à une teneur en eau plus élevée, mais par contre semble indépendante du fait que le grain soit agité ou non.

B. — *Mélange de grains secs et humides*

Il arrive quelquefois au niveau des organismes stockeurs que des lots de grains secs soient mélangés avec des lots de grains trop humides, de façon à obtenir une

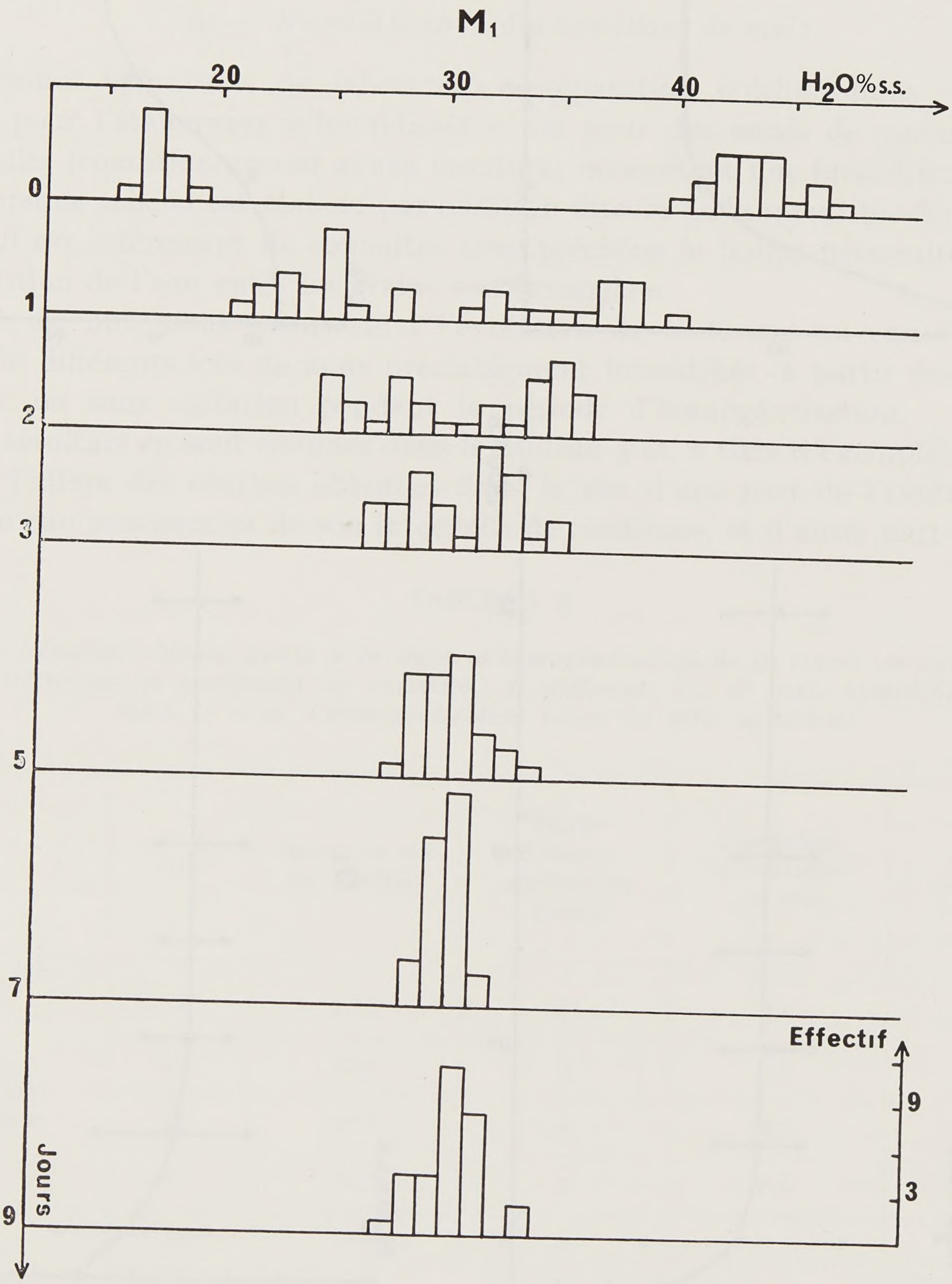


FIG. 10. — *Évolution, en fonction du temps, de la distribution de fréquence des teneurs en eau des lots M_1, M_2 et M_3*

teneur en eau moyenne se situant au niveau commercial ; il était intéressant d'examiner en fonction du temps de stockage l'évolution de la dispersion des teneurs en eau.

Cette étude a porté sur les trois mélanges suivants : M_1 (550 g, sans agitation) et M_2 (550 g, agité) sont préparés à partir de deux lots de teneurs en eau respectives 15 et 44,6 p. 100 SS ; M_3 (5 kg, agité) est obtenu à partir de deux lots de teneurs en eau respectives 17,5 et 45,8 p. 100 SS.

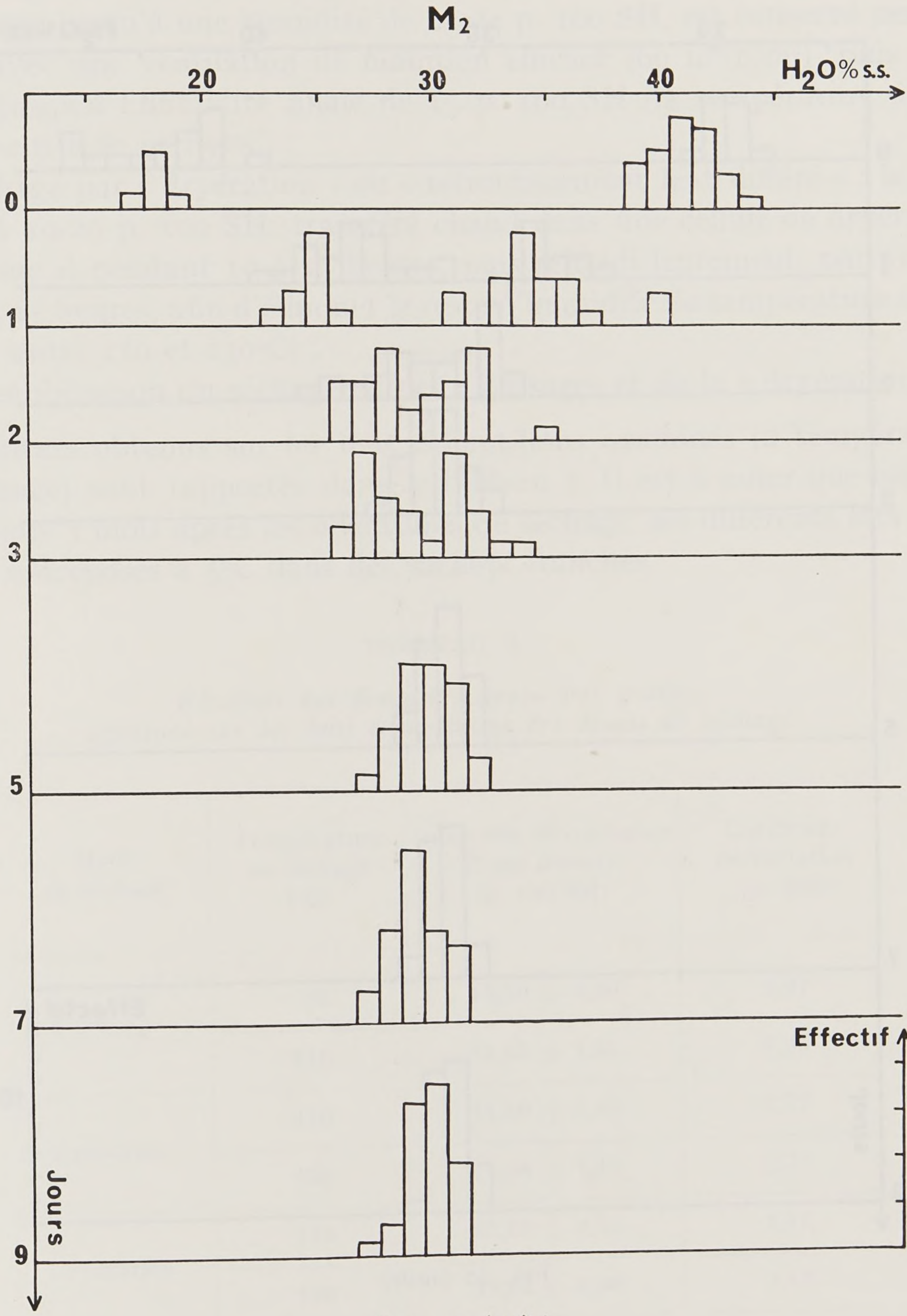


Fig. 10 (*suite*)

L'évolution des trois mélanges est mise en évidence par l'examen du coefficient de variation et des histogrammes de fréquence (fig. 10). On voit sur cette figure les deux populations de grains secs et humides, bien distinctes au temps zéro, se rapprocher progressivement, puis se mélanger jusqu'à ne plus former qu'une population unique après 3 à 5 jours. Ainsi le mélange apparaît homogène après 5 jours d'entre-

posage (avec ou sans agitation) avec un coefficient de variation de 2,5 à 3 p. 100, comparable à celui d'un lot de maïs tout venant.

On peut ainsi, par l'étude de l'histogramme de fréquence, déceler aisément la présence d'un mélange de deux populations de grains de teneurs en eau initialement différentes. Il resterait à examiner l'influence de cette opération sur l'aptitude à la conservation, en particulier quant au développement des moisissures.

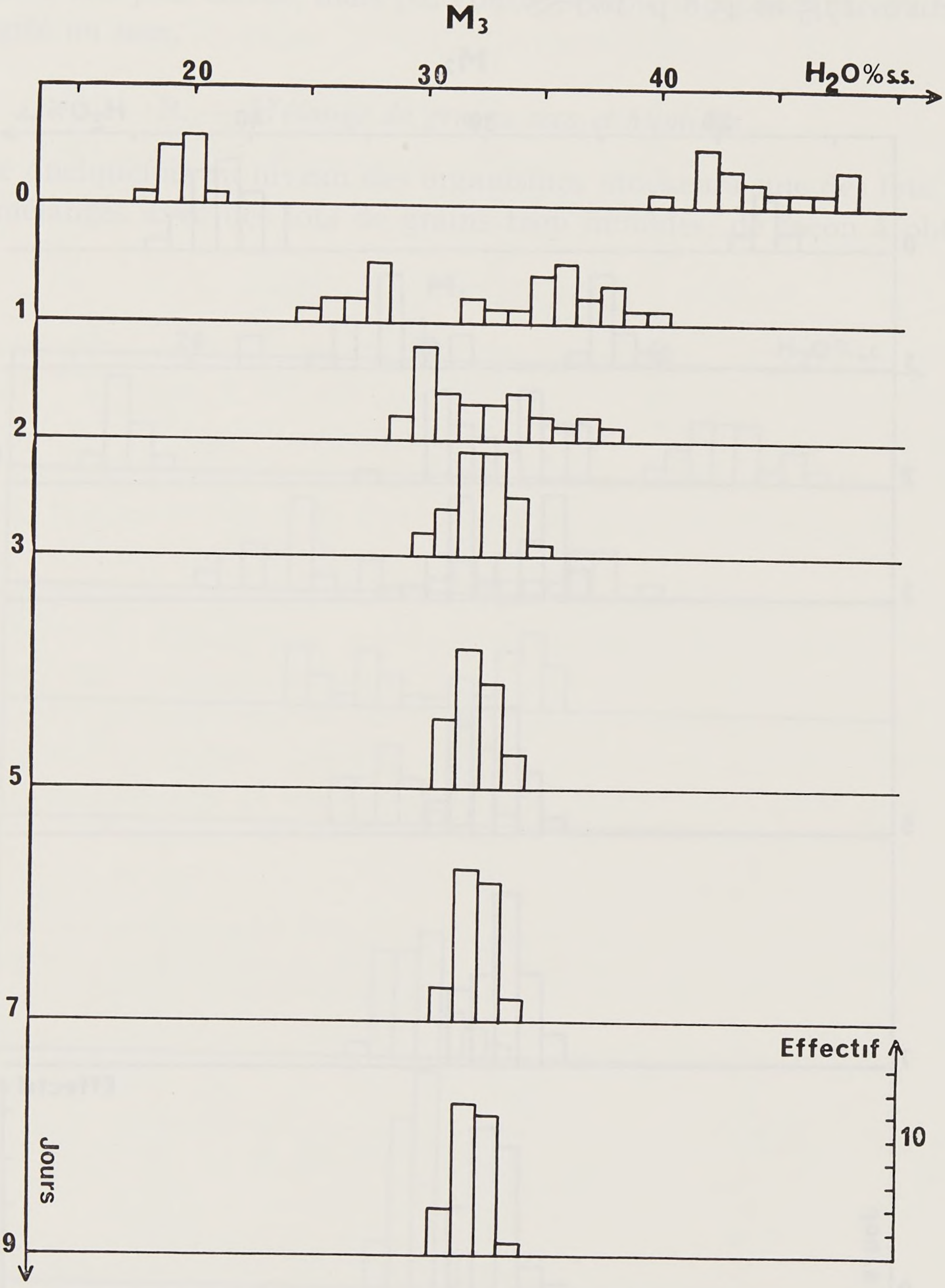


FIG. 10 (*suite*)

C. — *Séchage du maïs*

La méthode mise au point pour le dosage de l'eau « grain par grain » nous a également permis de tester différents types de séchage effectués dans des conditions très proches de la réalité.

Dans le cadre d'un programme d'étude sur la qualité amidonnière du maïs, des essais de séchage industriel ont été réalisés par l'I.T.C.F. (LASSERAN, 1973),

sur différentes variétés de maïs ; nous ne relaterons ici que les résultats de dispersion des teneurs en eau obtenus sur le maïs *INRA 260*. Les quatre types de séchage étudiés étaient les suivants :

- le séchage direct en un seul passage : le grain est séché, puis refroidi, en un seul passage, son humidité initiale (35 p. 100 SH ou plus) étant ramenée à 15-16 p. 100 SH (la température de séchage est comprise entre 80 et 130°C) ;
- le séchage en deux passages avec stockage intermédiaire : le grain subit un premier séchage jusqu'à une humidité de 22-24 p. 100 SH, est conservé pendant 3 à 4 semaines avec une ventilation de maintien efficace (60 $m^3/h/m^3$), puis est séché de nouveau jusqu'à l'humidité finale de 15 p. 100 SH (la température de séchage est comprise entre 80 et 130°C) ;
- le séchage par « dryération » ou « refroidissement lent différé » : le grain est séché jusqu'à 19-20 p. 100 SH, transféré chaud dans une cellule de dryération où il repose (« ressue ») pendant 10 à 12 heures, puis refroidi lentement, par ventilation, pendant 10 à 15 heures, afin d'éliminer le reste d'humidité (la température de séchage est comprise entre 110 et 130°C) ;
- une combinaison du séchage en deux passages et de la « dryération ».

Les résultats obtenus sur les huit échantillons examinés (2 températures par type de séchage) sont rapportés dans le tableau 5. Il est à noter que ces résultats ont été obtenus 3 mois après les opérations de séchage, les différents lots ayant été entre-temps entreposés à 5°C dans des sachets étanches.

TABLEAU 5

Résultats des dosages « grain par grain » effectués sur les huit échantillons des essais de séchage

Mode de séchage	Température de séchage (°C)	Intervalle de confiance d'une mesure (p. 100 SH)	Coefficient de variation (p. 100)
1 passage	90	15,30 ± 0,90	2,97
	110	15,65 ± 1,54	4,93
2 passages	110	14,40 ± 1,08	3,77
	130	14,38 ± 1,12	3,78
Dryération	110	15,10 ± 0,72	2,42
	130	14,62 ± 1,00	3,43
2 passages + Dryération	110	16,35 ± 1,30	3,98
	130	15,88 ± 0,52	1,63

A titre de comparaison, un échantillon séché en épis, par ventilation forcée d'air ambiant, puis égréné après séchage, possède les caractéristiques de dispersion suivantes : 15,92 ± 0,44 p. 100 SH ; V = 1,36 p. 100.

Quelques mesures effectuées juste en sortie de séchoir permettent d'apprécier l'évolution qui s'est faite pendant cet entreposage : on obtenait à 130°C dans le cas de « deux passages » un coefficient de variation V = 3,56 p. 100 au lieu de V = 4,93 p. 100 dans le cas de la dryération.

Une double tendance semble se dessiner à l'examen de ces premiers résultats :

- d'une part, le mode de séchage offrant le minimum d'hétérogénéité semble être la « dryération », ou une combinaison de cette technique avec la technique de séchage en deux passages ; ces deux techniques correspondent à une ventilation importante ;
- d'autre part, la température est un facteur important vis-à-vis de l'homogénéité quand on considère un type de séchage donné ; elle n'a par contre pas d'influence notable quand on la considère seule : on ne peut pas dire, par exemple, qu'une température de 110°C est préférable à 130°C, car cela dépend du mode de séchage considéré.

Il en résulte que le séchage conduisant aux résultats les plus homogènes est celui dont la température est la plus faible, pour la ventilation la plus forte.

Ainsi malgré l'homogénéisation qui s'est produite pendant un temps de repos de 3 mois, les différences apportées par les types de séchage peuvent toujours être mises en évidence.

CONCLUSION

Une méthode de dosage de l'eau « grain par grain » sur le maïs vient d'être décrite. Les dispersions mesurées peuvent s'expliquer par la conjonction de deux phénomènes : d'une part, une dispersion corrélative et réductible des pressions partielles de vapeur d'eau (donc des HRE) dans les grains, le long de la courbe de sorption ; d'autre part, l'hystérésis irréductible existant entre les courbes de sorption et de désorption à une même température.

Cette méthode permet, et c'est son intérêt, de suivre le comportement de lots de maïs ayant subi divers traitements : humidification, séchage, mélange... Elle permet donc, entre autres, de vérifier le bon fonctionnement des séchoirs à grains et peut aider à éviter l'altération des grains au cours du stockage, en détectant des foyers de grains anormalement humides. Enfin, la méthode « grain par grain » a contribué à apprécier la répétabilité et la reproductibilité des méthodes classiques de dosage de l'eau utilisées dans le cas des céréales, blé et maïs en particulier (MULTON *et al.*, 1975).

Reçu pour publication en juillet 1975.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué grace à la subvention de la Délégation générale à la Recherche scientifique et technique (Contrat 73-7-10-29 du Comité de Technologie agricole) à laquelle nous adressons nos plus vifs remerciements.

SUMMARY

STATISTICAL DISTRIBUTION OF THE WATER CONTENTS IN A MAIZE GRAIN POPULATION

In order to estimate the preservation capacity of maize, it is uniquely the average water content measured over a great number of grains which is taken into account. However, water content is not identical in each grain ; and the higher water contents create the greatest risks of deterioration.

A reference method developed for studying water content distribution is discussed ; it consists of drying at 130°C for 38 hours the whole grains isolated in each of the 10 alveoli of a multi-alveolar capsule (M.C.) which is placed in a CHOPIN drying oven. The various parameters of the mode of operation are then discussed. The number for each measurement having been fixed at 30, the temperature and drying duration were determined so as to obtain, for each M.C., an average value comparable with the results obtained by standard water quantity determinations. The calculation error shows maize grain water content to be ± 0,07 p. 100 (absolute value). The position of the grains in the M.C., the order of treatment, the position of the M.C. in the drying oven and the dry and wet weights of the grains have no significant effect.

The method is applied to studying water content distribution between grains. The distribution is shown to be gaussian with variation coefficients between 2 and 5 p. 100. The distribution of water contents is correlative with the distribution of the relative humidities in balance with the grains and independent of grain weight distribution. The water content of grains at rest tends to homogenize until a minimum threshold of ± 0,3 p. 100 absolute value is reached.

Lastly, some examples of the practical application of the method are given.

RESUMEN

DISTRIBUTION ESTATISTICA DE LOS CONTENIDOS DE AGUA EN UNA POBLACION DE SEMILLAS DE MAIZ

Para apreciar la aptitud del maíz para la conservación, únicamente se tiene en cuenta el contenido de agua medio, medido en un número elevado de granos. Ahora bien, el contenido de agua no es idéntico en todos los granos y ha de tenerse en cuenta que los más húmedos son aquellos que crean los riesgos elevados de alteración.

Se entra en materia respecto a un método de referencia puesto a punto para el estudio de la dispersión, que consiste en una desecación en estufa a 130°C durante 38 horas de los granos enteros aislados en cada uno de los 10 alvéolos de una cápsula multialveolar (C.M.), dispuesta a su vez en el interior de una estufa CHOPIN. Se indican, acto seguido, los distintos parámetros del método operatorio. La cantidad correspondiente a cada medida ha sido fijada en 30 y, por otro lado, la temperatura y la duración de la desecación han sido determinados con objeto de obtener, para cada C.M. un valor de promedio comparable a los resultados obtenidos para dosificaciones de agua convencionales. El cálculo de error demuestra que el contenido en agua de un grano de maíz es conocido con una precisión de ± 0,07 p. 100 (valor absoluto). El lugar de los granos en la C.M., el orden de procesamiento y la posición de las C.M. en la estufa, así como los pesos secos y húmedos de los granos, no tienen ningún efecto significativo.

El método es aplicado al estudio de la distribución de los contenidos de agua entre granos. Se demuestra que ésta es gaussiana, con coefficientes de variación que se sitúan entre 2 y 5 p. 100. La distribución de los contenidos de agua es correlativa con la distribución de las humedades relativas en equilibrio con los granos e independiente de la del peso de los granos. El contenido de agua de los granos en reposo tiende a homogeneizarse, hasta un límite mínimo de ± 0,3 p. 100 en valor absoluto.

RIASSUNTO

DISTRIBUZIONE STATISTICA DEI TENORI D'ACQUA IN UNA POPOLAZIONE DI CHICCHI DI GRANTURCO

Finalmente, son presentados algunos ejemplos de aplicación práctica del método.

Per valutare l'attitudine del granturco alla conservazione, non si tiene conto che del tenore d'acqua medio misurato su un elevato numero di chicchi. Ora, il tenore d'acqua non è identico in tutti i chicchi, essendo ai più umidi che sono legati i rischi maggiori d'alterazione.

Viene esaminato un metodo di riferimento messo a punto per lo studio della dispersione dei tenori d'acqua. Questo metodo consiste in un essiccamento a 130°C per una durata di 38 ore di chicchi interi isolati in ognuno dei 10 alveoli di una capsula multialveolare (C.M.) la quale è posta in un essiccatoio CHOPIN. Vengono poi discussi i diversi parametri del modo di operare. La quantità oggetto dell'esperimento è stata fissata a 30 e la temperatura e la durata di essiccamento sono state determinate in modo da ottenere per ogni C.M. un valore medio comparabile ai risultati ottenuti con dosaggi d'acqua classici. Il calcolo d'errore dimostra che il tenore d'acqua di un chicco di granturco è noto a ± 0,07 p. 100 (valore assoluto). Il posto dei chicchi nella C.M., l'ordine di trattamento e la posizione delle C.M. nell'essiccatoio, i pesi secchi ed umidi dei chicchi non hanno alcun effetto significativo.

Il metodo è applicato allo studio della distribuzione dei tenori d'acqua tra chicchi. Si dimostra che questo metodo è gaussiano con dei coefficienti di variazione che si situano tra 2 e 5 p. 100. La distribuzione dei tenori d'acqua è in correlazione con la distribuzione delle umidità relative in equilibrio con i chicchi ed essa è indipendente da quella del peso dei chicchi. Il tenore d'acqua dei chicchi al riposo tende a omogeneizzarsi fino a un limite minimo di ± 0,3 p. 100 in valore assoluto.

Sono infine presentati alcuni esempi d'applicazione pratica del metodo.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR, 1973. Maïs. Évaluation de la teneur en eau. Norme expérimentale NF-V-03-708.

BLOC D., GOUET J.-P., 1974. Influence des sommes de températures sur la maturité du maïs. Document interne I.T.C.F.-A.G.P.M.

DAUPHIN J., 1970. La situation du stockage des céréales. *Bull. Techn. Inf.*, (255), 667-673.

DAVIN A., GUILBOT A., 1964. Rapport d'activité du groupe de travail « Dosage de l'eau » de l'I.C.C (diffusion restreinte).

GREENAWAY W. T., MCGINTRY R. J., DAVIS G., WATSON C. A., 1974. A rapid proximate method to determine moisture content of single kernels of corn. *A.A.C.C. 59th Annual Meeting*, Montreal, October 20-24 (non publiée).

GUILBOT A., MULTON J.-L., MARTIN G., 1971. Les problèmes posés par l'étalonnage des appareils électriques doseurs d'eau rapides dans les grains et graines. *Technique des Industries Céréalières*, **132**, 7-13.

GUILBOT A., MULTON J.-L., MARTIN G., 1973. La détermination de la teneur en eau des semences. *Seed Sci. Technol.*, **1**, 587-611.

HART J. R., 1967. A method for detecting mixtures of artificially dried corn with high-moisture corn. *Cereal Chem.*, **44** (6), 601-606.

I.C.C., 1960. Dosage de l'eau dans les céréales et les produits céréaliers. Standards n° 109-110.

I.S.O., 1965. Dosage de l'eau dans les céréales et les produits céréaliers I.S.O.-R-711 et 712.

KLINE G. L., 1973. Dommages physiques subis par le maïs au cours de la récolte mécanique et du séchage à l'air chaud ; dans « Conservation des grains récoltés humides ». *Ann. Technol. Agric.*, numéro hors-série, 77-83.

LASSERAN J.-C., 1973. Incidence of drying and storing conditions of corn on its quality for starch industry. *Die Stärke*, **25** (8), 973.

MULTON J.-L., GUILBOT A., 1967. Méthode de détermination rapide des isothermes de sorption de vapeur d'eau. *Ann. Technol. Agric.*, **16** (1), 5-25.

MULTON J.-L., POISSON J., GUILBOT A., 1969. Les altérations du grain de blé après la récolte. *Bull. Tech. Inf.*, (244), 853-870.

MULTON J.-L., GUILBOT A., 1973. Conservation des grains récoltés humides. Compte rendu du Symposium International, 5-10 mars 1973, Paris, France. *Ann. Technol. Agric.*, numéro hors-série.

MULTON J.-L., MARTIN G., BEULLIER G., 1975. Le dosage de l'eau dans les produits céréaliers : validité et précision des résultats obtenus. *Bulletin Technique du BIPEA*.

OXLEY T. A., 1948. Study of the water content of single kernels of wheat. *Cereal Chem.*, **25** (2), 111-127.

SCHWARTZ D., 1972. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. *Collection Médecine-Sciences*, Flammarion éd., Paris (3e édition).

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (1), 29-44.

ÉVOLUTIONS COMPARÉES DES CONSTITUANTS VOLATILS ET DE LA MICROFLORE DE MAÏS STOCKÉS SOUS DIFFÉRENTES CONDITIONS DE TEMPÉRATURE ET D'HUMIDITÉ

D. RICHARD-MOLARD, B. CAHAGNIER, J. POISSON
et R. DRAPRON
avec la collaboration technique de C. DESSERME

Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales,
Section Microbiologie I. N. R. A.,
16, rue Nicolas Fortin,
75013 Paris

RÉSUMÉ

Au cours de stockages expérimentaux de grains de maïs placés en atmosphère non ventilée, on a suivi parallèlement l'évolution des constituants volatils des grains et de la microflore associée.

Lorsque les micro-organismes ne peuvent se multiplier, la fraction volatile des grains ne se modifie pas sensiblement au cours du temps. Par contre, dans les conditions hydrothermiques qui permettent le développement de la microflore, notamment celui des espèces fongiques constituant la mycoflore dite « de stockage », des composés volatils sont formés dans les grains.

Parmi ceux-ci, certains, comme l'octène-1-ol-3, apparaissent dès les premières heures de stockage et peuvent être détectés précocement par chromatographie en phase gazeuse.

D'après ces premiers résultats, il paraît possible, au niveau industriel, de déceler un tout début d'activité de la microflore des grains, par détection de substances volatiles indicatrices et ainsi d'assurer une surveillance efficace des stocks, du point de vue microbiologique.

Mots clés : *maïs, stockage, microflore, constituants volatils.*

INTRODUCTION

Ces dernières années ont vu se modifier considérablement les conditions de récolte du maïs en France. L'extension progressive des cultures vers des zones climatiques plus humides conduit à la récolte de grains ayant des teneurs en eau très élevées, oscillant fréquemment entre 35 p. 100 et 40 p. 100 et même davantage.

Simultanément, la mécanisation intégrale permet de raccourcir considérablement les opérations de récolte, ce qui, compte tenu de l'accroissement très important du niveau des collectes, provoque des engorgements au niveau du séchage.

Dans ces conditions, le préstockage des grains humides devient inévitable et les risques d'altération rapide, par voie microbienne en particulier, s'en trouvent considérablement accrus (MULTON, POISSON et GUILBOT, 1969).

L'activité des micro-organismes, parmi lesquels les moisissures jouent un rôle prépondérant, se traduit par la dégradation des constituants du grain et l'élaboration de substances néoformées, de toxines notamment. De plus, ces actions s'accompagnent d'un dégagement de chaleur, dont l'accumulation au niveau des grains accélère les processus. Lorsqu'un préstockage est inévitable, des travaux récents ont conduit à préconiser deux types de conditionnement, soit la ventilation des grains humides par air refroidi, soit un préséchage jusqu'à une teneur en eau de 20 p. 100 suivi d'une ventilation de maintien. Dans les deux cas, on évite l'échauffement spontané des lots, mais la stabilisation microbiologique n'est pas réalisée. Par conséquent, si l'on veut conserver au grain toute sa valeur, il paraît indispensable d'exercer une surveillance microbiologique des stocks, de manière à intervenir à temps et en priorité sur les lots les plus instables.

Les méthodes analytiques dont nous disposons dans ce domaine sont difficilement applicables, les résultats n'étant pas connus assez rapidement. On sait cependant que l'activité des micro-organismes s'accompagne, le plus généralement, d'une production de substances volatiles qui peuvent conférer aux grains des odeurs de moisi ou de renfermé (KRETOVICH et PROKHOROVA, 1960). La composition de la fraction volatile de grains sains a été étudiée (MCWILLIAMS et MACKEY, 1969; HOUGEN, QUILLIAN et CURRAN, 1971), et certaines substances volatiles formées par diverses souches de moisissures, cultivées sur grains broyés, ont pu être identifiées (KAMINSKY *et al.*, 1973, 1974).

Pour notre part, nous avons récemment mis au point une méthode rapide permettant d'obtenir ces produits volatils avec une concentration suffisante pour permettre leur analyse par chromatographie en phase gazeuse (RICHARD-MOLARD et DRAPRON, 1975).

Les résultats obtenus permettent d'envisager la détection d'un tout début d'activité de la microflore des grains par identification de substances volatiles spécifiques. Dans ce but, l'étude a été poursuivie en suivant, en fonction du temps et sous différentes conditions de température et d'humidité, l'évolution des constituants volatils des grains de maïs, parallèlement à celle de la microflore associée.

MATÉRIEL, PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL. MÉTHODES D'ANALYSE

Matériel

Le maïs utilisé pour ces expériences (*INRA 260*) provient de la région parisienne et a été récolté à une teneur en eau de 39 p. 100 par rapport à la substance humide (SH). Suivant les essais, le grain a été mis en expérimentation soit aussitôt après récolte, soit après séchage par ventilation jusqu'à des teneurs en eau de 20 p. 100 et 15 p. 100 SH.

Protocole expérimental

Les lots de grains sont stockés en atmosphère semi-confinée, dans des enceintes de verre cylindriques de 10 litres, permettant des échanges gazeux restreints avec l'extérieur. Dans chaque enceinte sont suspendus 9 sachets en tissu de polyamide (ouverture de maille 1600 µ) contenant chacun 150 g de grains. Avant la répartition en sachets, les lots sont homogénéisés durant 30 mn dans un mélangeur cubique tournant autour d'un axe diagonal à 64 t/mn.

L'humidité relative (HR) est maintenue constante par mise en équilibre avec des solutions aqueuses saturées de sels minéraux (K_2SO_4 : HR = 98 p. 100 ; KCl : HR = 87 p. 100 ; NaCl : HR = 75 p. 100), les teneurs en eau des grains étant respectivement voisines de 33 p. 100, 20 p. 100 et 15 p. 100 (SH).

Sous l'humidité relative la plus élevée (98 p. 100), certaines bactéries, les levures et les moisissures peuvent se développer activement. Sous une humidité relative de 87 p. 100, seules certaines moisissures (moisissures de stockage) sont en mesure de se multiplier tandis que sous une humidité relative de 75 p. 100, même les espèces xérophiles ne montrent qu'une très faible activité (CAHAGNIER, 1971).

Dans chaque cas, l'effet de la température a été examiné en plaçant des enceintes dans deux chambres thermostatées à 22°C et 5°C.

A chaque prélèvement, le contenu de deux sachets, soit 300 g de grains, est soumis, après mélange, à l'analyse microbiologique, à l'analyse des constituants volatils et à la détermination de la teneur en eau.

Méthodes

Détermination de la teneur en eau.

La teneur en eau est déterminée en séchant 10 g de grains entiers à l'étuve à 130°C pendant 38 heures, c'est-à-dire jusqu'à masse pratiquement constante (GUILBOT, 1969). Les résultats sont exprimés en p. 100 de la substance humide.

Analyse de la microflore des grains.

Préparation de la suspension-mère.

Les micro-organismes, bactéries, levures et moisissures, qui constituent la microflore des grains, sont dénombrés à partir d'une « suspension-mère » dont la préparation a été spécialement adaptée au cas du maïs (POISSON et CAHAGNIER, 1972).

Environ 150 g de grains sont prélevés, pesés exactement et versés aseptiquement dans un bol « mixer Waring-Blendor » en acier inoxydable de 1 000 ml, contenant 400 ml de diluant stérile (NaCl : 9 g ; Bactopeptone Difco : 1 g ; Tween 80 : 0,003 g ; eau distillée : q.s.p. 1 000 ml). Après 20 mn de trempage pour revivifier les micro-organismes, les grains sont broyés pendant 90 secondes à 12 500 t/mn. Le broyat obtenu est dilué au 1/5 et la nouvelle suspension obtenue est homogénéisée pendant 10 mn à l'aide d'un agitateur secoueur à raison de 250 mouvements par minute.

Analyse de la suspension-mère.

Le dénombrement des micro-organismes de la suspension-mère est effectué suivant la méthode classique des dilutions décimales et ensemencements en boîtes de Petri contenant les milieux de cultures appropriés. Les milieux utilisés figurent parmi ceux employés en mycologie et en microbiologie générale, et sont additionnés suivant les cas d'un antibiotique (oxytétracycline) ou d'un antifongique (actidione).

Gélose pour numération	: Peptone pancréatique de caséine : 2,5 g ; Extrait de levure déshydraté : 4 g ; Gélose : 12 g ; Eau : q.s.p. 1 000 ml ; pH7.
Milieu « Malt »	: Malt Difco : 20 g ; Gélose : 20 g ; Eau : q.s.p. 1 000 ml ; pH 7.
Milieu pour Osmophiles	: Malt Difco : 20 g ; NaCl : 70 g ; Saccharose : 50 g ; Gélose : 14 g ; Eau : q.s.p. 1 000 ml ; pH 7.

Les durées d'incubation sont de 72 heures à 30°C pour les bactéries et les levures et de 5 jours à 25°C pour les moisissures. Les résultats sont exprimés en nombre de germes par gramme de grain, ce qui, dans le cas des moisissures, correspond essentiellement au nombre de spores formées.

Analyse des constituants volatils.

Extraction et concentration.

Les constituants volatils sont extraits d'un échantillon de 100 g de matière sèche, suivant une méthode rapide précédemment mise au point (Richard-Molard et Drapron, 1975) dont le principe est le suivant :

Après refroidissement à 0°C, les grains sont broyés dans un mixer Waring-Blendor durant 1 mn à 25 000 t/mn, puis rapidement transferrés dans un ballon de 1 000 ml qui est alors raccordé à un condenseur du type « doigt froid ». Les produits volatils sont désorbés sous vide partiel (1-10 torrs), à l'aide d'une pompe à palettes fonctionnant en continu pendant 90 mn, et piégés sur le condenseur refroidi à —78°C par un mélange éthanol-glace carbonique.

La fraction piégée est alors décongelée puis extraite par un volume égal de chlorure de méthylène. Les deux phases sont ensuite séparées et la phase organique concentrée par évaporation partielle du solvant à l'aide d'un courant d'azote jusqu'à un volume résiduel de 50 microlitres, que l'on conserve ensuite dans une ampoule de verre scellée.

Chromatographie en phase gazeuse.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse est réalisée avec un chromatographe Girdel 75, équipé d'une colonne capillaire en acier de 25 m de long et d'un diamètre intérieur de 0,5 mm, garnie de Carbowax 20-M.

L'appareil fonctionne en isotherme à 80°C, le débit du gaz vecteur (N_2) est de 5 ml/mn. Le volume injecté est de 2 µl, le diviseur d'entrée étant réglé de telle sorte qu'environ 5 p. 100 de ce volume soient introduits dans la colonne.

Les comparaisons entre chromatogrammes sont faites sur la base des volumes de rétention et de l'aire des pics estimée suivant la formule $A = 0{,}63$ HL où H est la hauteur du pic et L sa largeur à la base, entre les tangentes d'inflexion.

Caractérisation et identification des produits volatils.

Certains composants ont pu être identifiés par spectrométrie de masse en couplage avec un chromatographe équipé d'une colonne de 6 m de long et 2 mm de diamètre intérieur, garnie de Chromosorb W(80-100) à 10 p. 100 de Carbowax 20-M. L'analyse a été faite sur un concentrat obtenu après deux extractions réalisées sur les grains conservés 12 jours à 22°C et à une teneur en eau de 33 p. 100 (SH). Les produits identifiés ont ensuite été repérés sur les chromatogrammes obtenus sur colonne capillaire, à l'aide de produits purs du commerce.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Évolutions comparées de la microflore et des produits volatils d'un maïs humide

a) *Stockage à 22°C.*

Les grains ayant une teneur en eau de 33 p. 100 sont stockés immédiatement après récolte, en atmosphère non ventilée à 22°C. Ils sont le siège d'un envahissement rapide par des moisissures qui, au début, sont surtout des espèces appartenant à la mycoflore dite « champêtre » (*Cladosporium* sp., *Verticillium* sp., *Cephalosporium* sp.). A partir du troisième jour, la mycoflore dite « de stockage » (*Penicillium* sp.) devient décelable, puis s'accroît rapidement pour devenir dominante à partir du neuvième jour. Les levures se multiplient activement sur les grains jusqu'aux environs du troisième jour, puis restent pratiquement stables durant toute l'expérience. La flore bactérienne mésophile qui, au départ, se situe à un niveau élevé, s'accroît légèrement durant les premiers jours, se stabilise vers le cinquième jour, puis régresse progressivement (fig. 1).

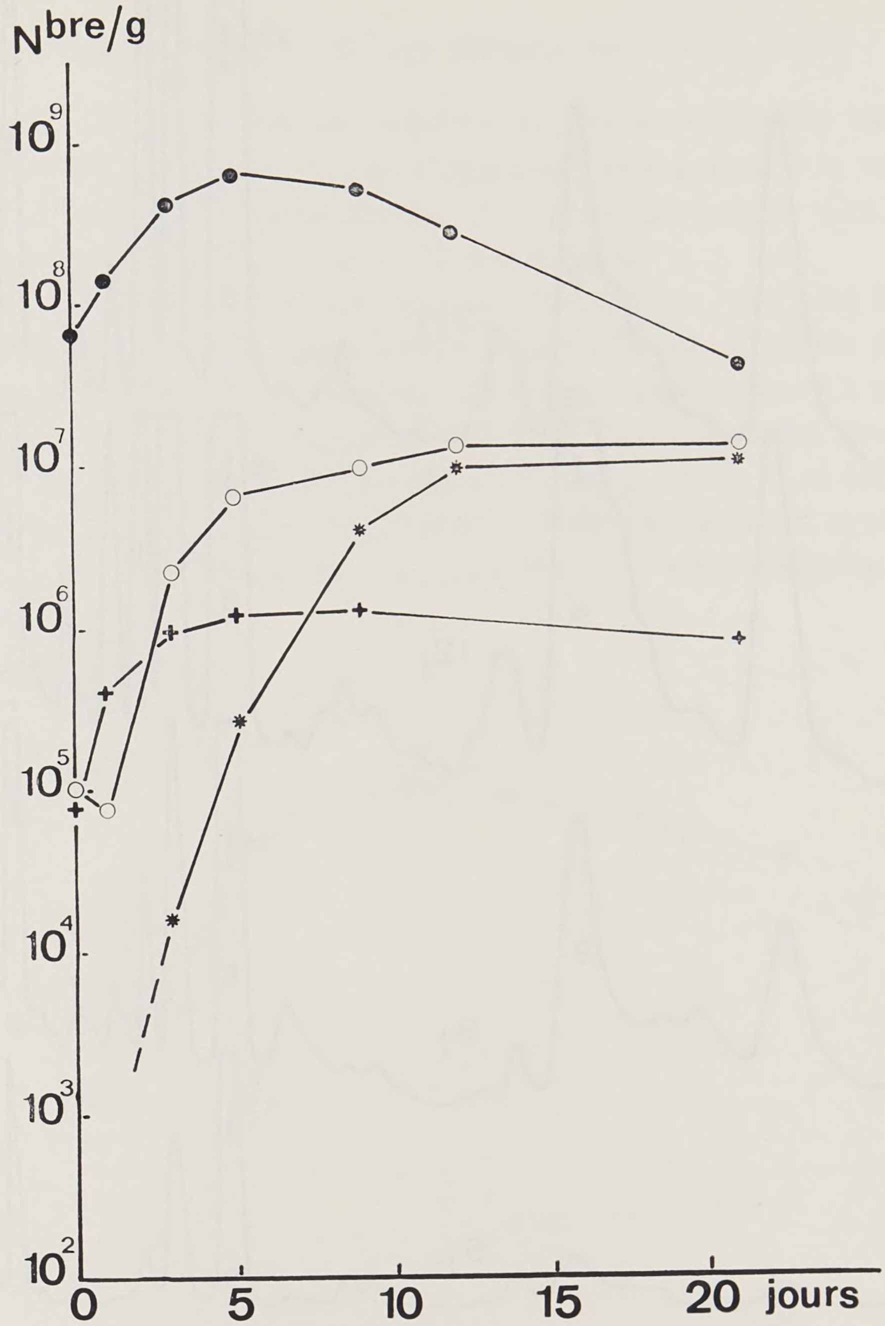


FIG. 1. — *Maïs-grain stocké à 22°C et 33 p. 100 de teneur en eau*
Évolution de la microflore

● ——— ● Bactéries,
○ ——— ○ Mycoflore totale,
* ——— * Mycoflore de stockage,
+ ——— + Levures.

TABLEAU I

Constituants volatils isolés de grains de maïs stockés durant 12 jours à 22°C et 33 p. 100 de teneur en eau

Nature des constituants volatils identifiés			
N°		N°	
1	Hexanal	6	Hexanol-1
2	Méthyl-3-butanol-1	7	Octanol-3
3	Pentanol-1	8	Octène-1-ol-3
4	Octanone-3	9	Ethylanisole ?
5	Acétoïne (hydroxy-3-butanone-2)		

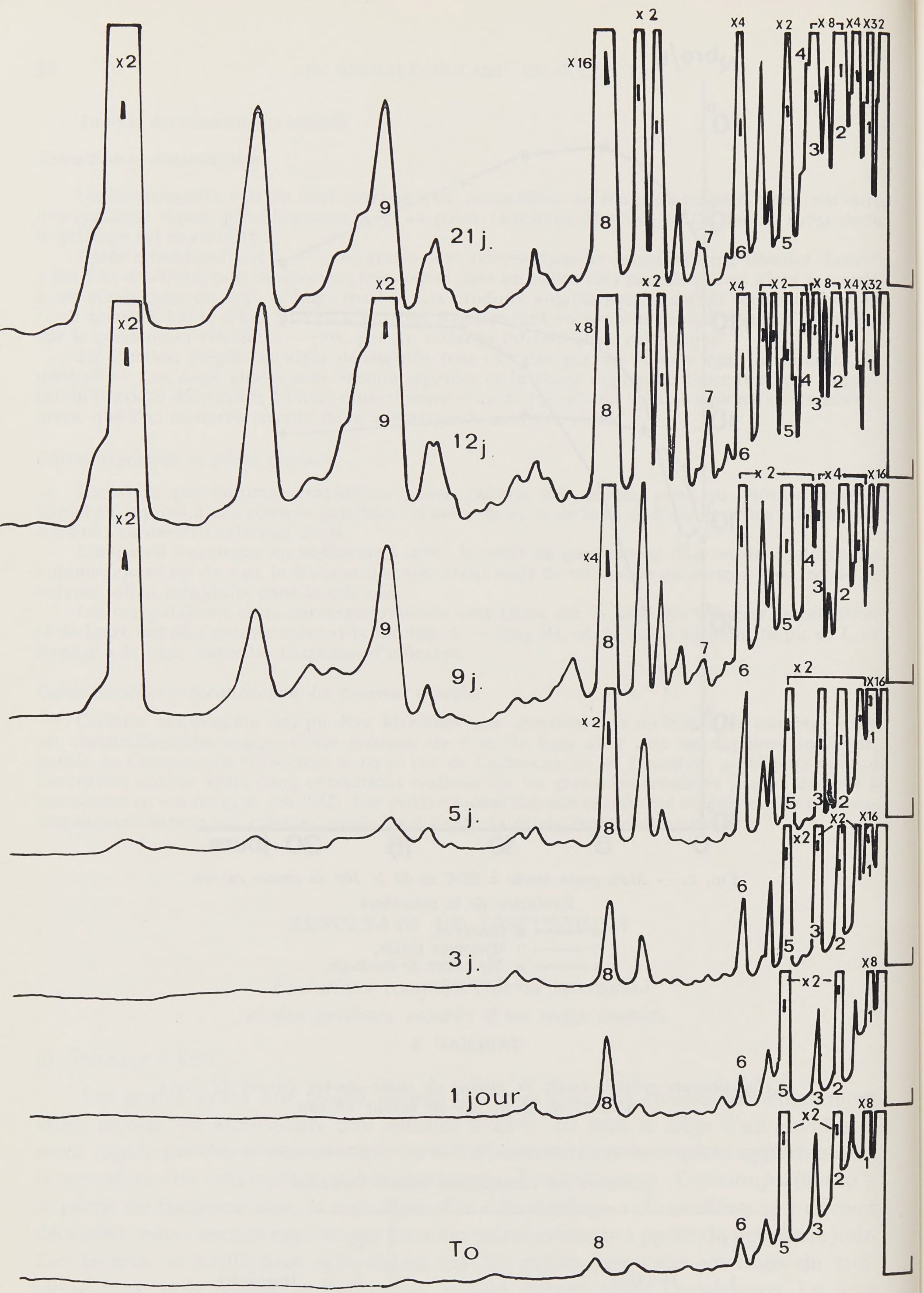


FIG. 2. — *Maïs-grain stocké à 22°C et 33 p. 100 de teneur en eau*

Évolution des constituants volatils

Conditions d'analyse chromatographique : Appareil Girdel 75 FD-I. Chromatographie isotherme à 80°C sur colonne capillaire de 25 m. ∅ int. 0,5 mm, en acier, Carbowax 20-M. Pression d'entrée 0,2 b., diviseur réglé à 5 p. 100. Quantité injectée 2 µl. Atténuation xI sauf indication. Déroulement 1 cm/mn. Détection par ionisation de flamme.

Dans ces conditions, la fraction volatile des grains se modifie très sensiblement (fig. 2). Par rapport au témoin T_0 qui correspond aux grains à la récolte, de nombreux constituants volatils apparaissent au cours du temps. Les identifications qui ont pu être faites sont rapportées dans le tableau I.

L'évolution des pics nº 6 (hexanol-1) et nº 8 (octène-1-ol-3) est à rapprocher de celle des moisissures et paraît intéressante puisqu'elle est décelable dès les premiers jours de stockage. La formation d'hexanol dans les grains moisis n'a pas été jusqu'ici décrite. Par contre, l'origine fongique de l'octène-1-ol-3 dans les produits céréaliers ne semble pas faire de doutes (KAMINSKI *et al.*, 1973, 1974), et sa formation à partir de la fraction lipidique du grain est probable, différents auteurs ayant, par ailleurs, montré qu'il peut être obtenu par dégradation de l'acide linoléique (HOFFMANN,

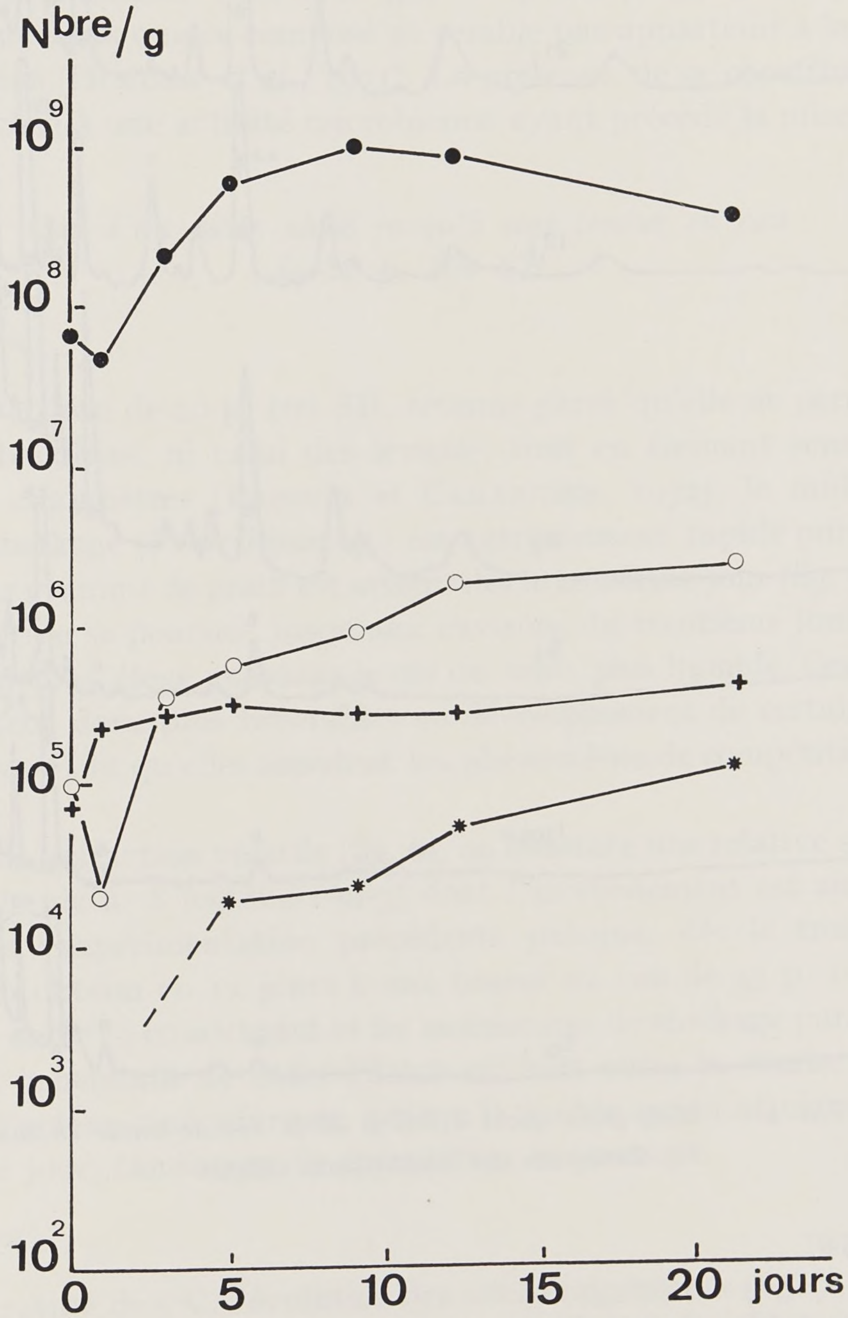


FIG. 3. — *Maïs-grain stocké à 5ºC et 33 p. 100 de teneur en eau*

Évolution de la microflore

● ——— ● Bactéries,
○ ——— ○ Mycoflore totale,
* ——— * Mycoflore de stockage,
\+ ——— + Levures.

1962, PARSONS, 1973). De par son odeur marquée de « champignon », ce composé intervient certainement de façon prépondérante dans l'odeur des grains altérés.

Les composés élués en fin de chromatographie, et qui apparaissent en quantité importante, ne présentent pas le même intérêt du fait qu'ils sont formés trop tardivement à un stade où le grain est déjà fortement altéré.

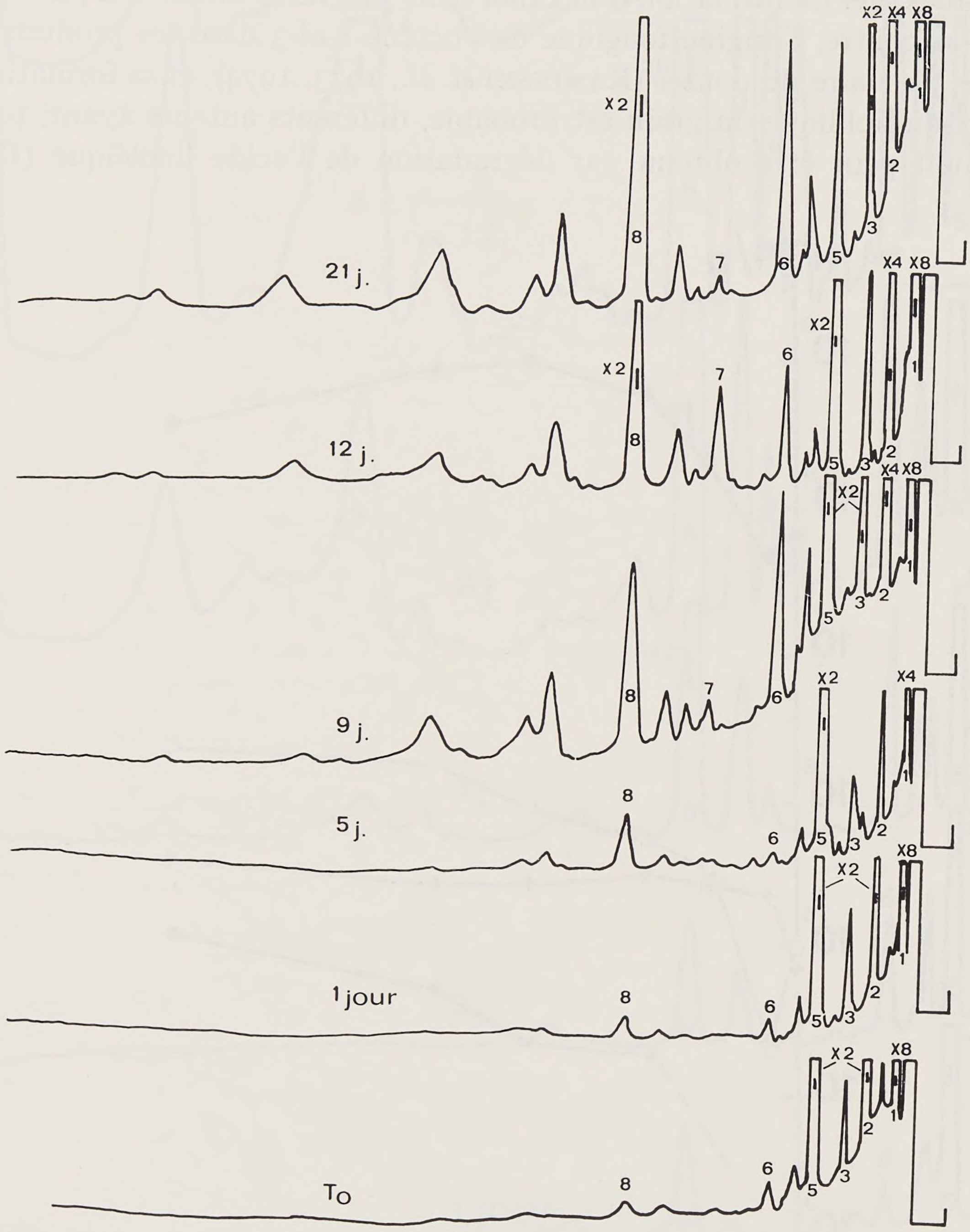


FIG. 4. — *Maïs-grain stocké à 5°C et 33 p. 100 de teneur en eau*
Évolution des constituants volatils

b) *Stockage à 5°C.*

Des grains stockés à la même teneur en eau que précédemment, mais à une température de 5°C, montrent une évolution microbiologique très différente (fig. 3).

La multiplication des bactéries paraît peu affectée par cette température avec toutefois un développement retardé suivi d'une régression plus lente, les moisissures par contre se montrent sensiblement moins actives.

Les espèces « champêtres » restent prédominantes durant toute l'expérience, la mycoflore de stockage atteignant à peine le niveau de 10^5 germes par gramme de grain. On reste cependant loin de la stabilité microbiologique, l'accroissement des moisissures à cette température étant bien marqué, comme cela a été précédemment indiqué lors de stockages en atmosphère renouvelée (LAGRANDEUR et POISSON, 1968).

La multiplication des levures est ici moins active qu'à 22°C, et la population reste pratiquement stable à partir du troisième jour.

L'évolution de la fraction volatile est beaucoup moins importante qu'à 22°C (fig. 4). Les principaux constituants volatils qui se forment en fonction du temps au cours de l'expérience sont le méthyl-3-butanol-1 (pic n° 2), le pentanol-1 (pic n° 3), l'hexanol-1 (pic n° 6) et l'octène-1-ol-3 (pic n° 8).

Comme précédemment, l'acétoïne (pic n° 5) est présente en quantité importante dès l'origine, alors que ce composé ne semble pas appartenir à la fraction volatile de grains sains (HOUGEN *et al.*, 1971). La présence de ce constituant peut sans doute être rattachée à une activité microbienne ayant précédé la mise en expérience.

Cas d'un maïs séché jusqu'à une teneur en eau de 20 p. 100 SH

a) *Stockage à 22°C.*

A la teneur en eau de 20 p. 100 SH, retenue parce qu'elle ne permet ni le développement des bactéries, ni celui des levures, tout en freinant sensiblement celui des moisissures champêtres (POISSON et CAHAGNIER, 1972), la multiplication des moisissures de stockage (*Penicillium* sp.) est extrêmement rapide puisque le niveau de 10^6 germes par gramme de grain est atteint dès le troisième jour (fig. 5). Cette multiplication très active se poursuit jusqu'aux environs du trentième jour et atteint un niveau beaucoup plus élevé que dans le cas du maïs plus humide. Ces conditions de stockage paraissent donc plus favorables au développement de certains *Penicillium*, soit par effet direct, soit qu'elles annulent les phénomènes de compétitions inter-spécifiques.

Au niveau de la fraction volatile (fig. 6), on constate une relative stabilité, exception faite pour le pic n° 8 (octène-1-ol-3) dont l'accroissement est au contraire plus rapide que dans l'expérimentation précédente puisque, dès le troisième jour, on atteint le niveau obtenu en 12 jours à une teneur en eau de 33 p. 100 SH.

La relation entre ce constituant et les moisissures de stockage paraît ici évidente.

Il convient cependant de noter l'écart existant entre la courbe de sporulation et la quantité d'octène-1-ol-3 formée, puisqu'il semble qu'on atteigne un maximum vers le huitième jour, tandis que la sporulation se poursuit.

b) *Stockage à 5°C.*

A la température de 5°C, l'évolution des micro-organismes (fig. 7) est très comparable à celle observée précédemment, et seules les moisissures de stockage se développent, présentant cependant une sporulation moins rapide, le maximum n'étant sans doute pas atteint après 36 jours de stockage. Dans ces conditions, la production d'octène-1-ol-3 se fait également plus lentement (fig. 8). Ce composé mis à part, la fraction volatile évolue peu, dans son ensemble.

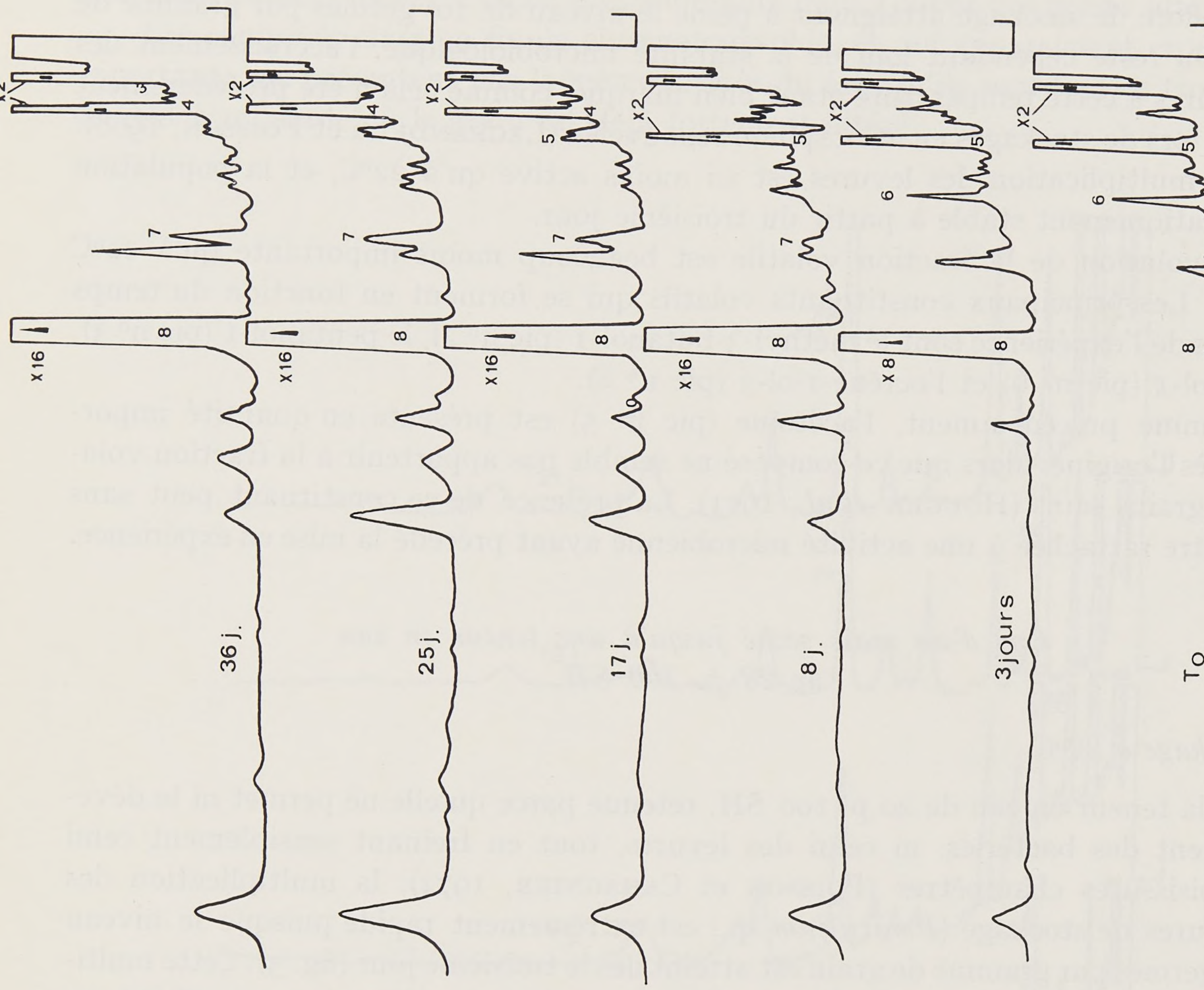


Fig. 6. — *Maïs-grain stocké à 22°C et 20 p. 100 de teneur en eau*
Évolution des constituants volatils

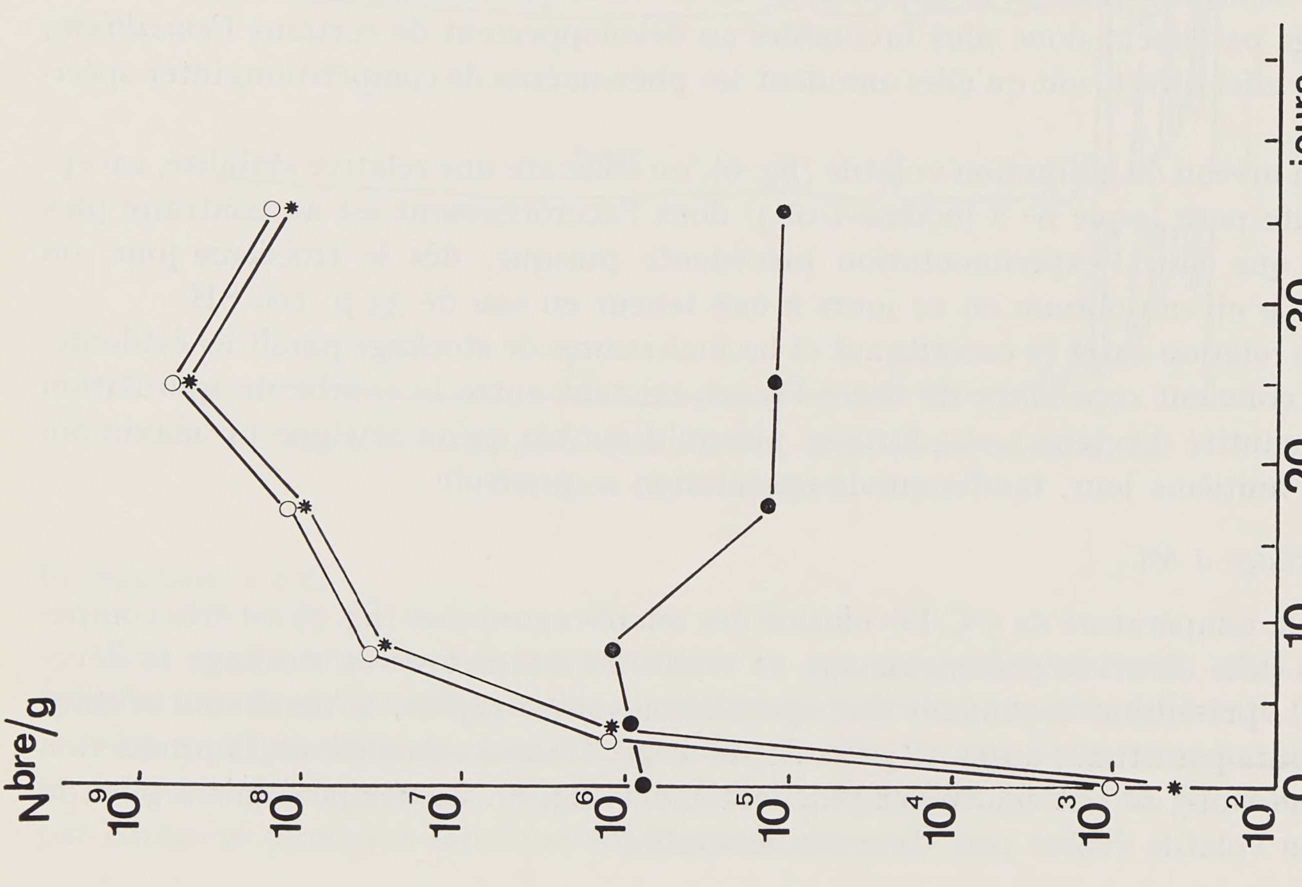


Fig. 5. — *Maïs-grain stocké à 22°C et 20 p. 100 de teneur en eau*
Évolution de la microflore

● ——— ● Bactéries,
○ ——— ○ Mycoflore totale,
* ——— * Mycoflore de stockage.

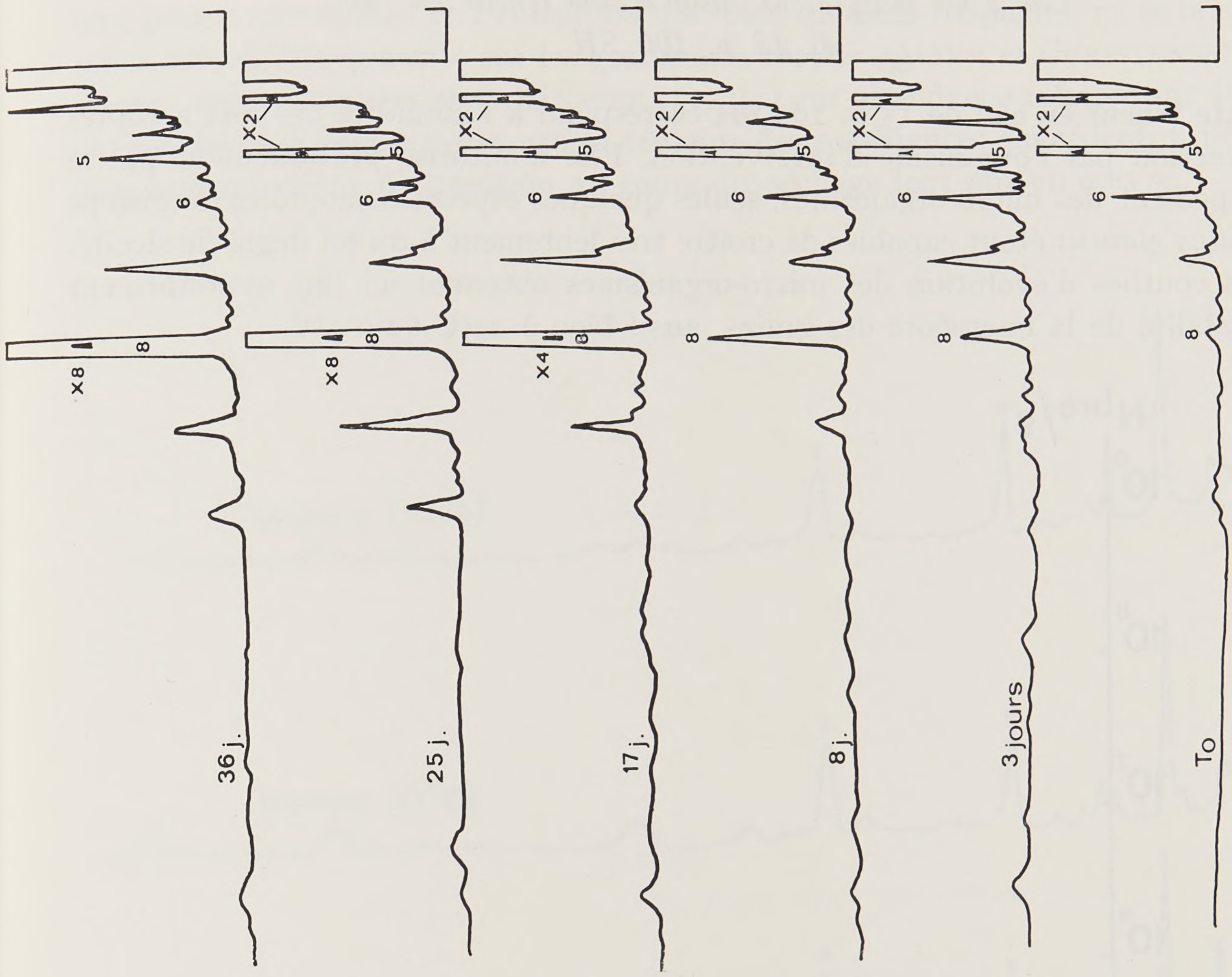


FIG. 8. — *Maïs-grain stocké à 5°C et 20 p. 100 de teneur en eau*

Évolution des constituants volatils

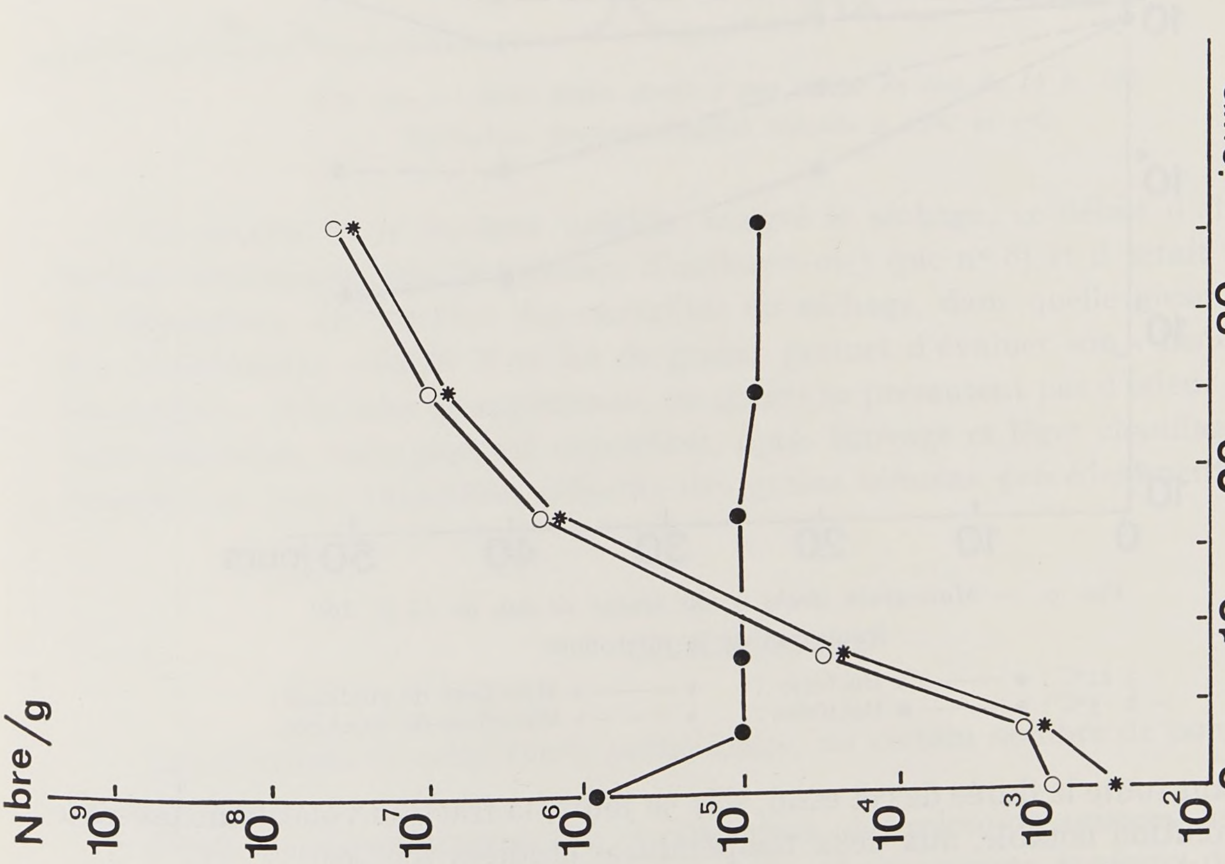


FIG. 7. — *Maïs-grain stocké à 5°C et 20 p. 100 de teneur en eau*

Évolution de la microflore

● ——— ● Bactéries,
○ ——— ○ Mycoflore totale,
* ——— * Mycoflore de stockage.

Cas d'un maïs séché jusqu'à une teneur en eau de 15 p. 100 SH

Cette teneur en eau de 15 p. 100 SH correspond à l'humidité des lots acceptés sans réfaction par l'organisme d'intervention. Elle n'autorise pratiquement pas le développement des micro-organismes, seules quelques espèces osmophiles du groupe *Aspergillus glaucus* étant capables de croître très lentement à un tel degré de siccité.

Les courbes d'évolution des micro-organismes obtenues ici (fig. 9) confirment cette stabilité de la microflore des grains, aussi bien à 22°C qu'à 5°C.

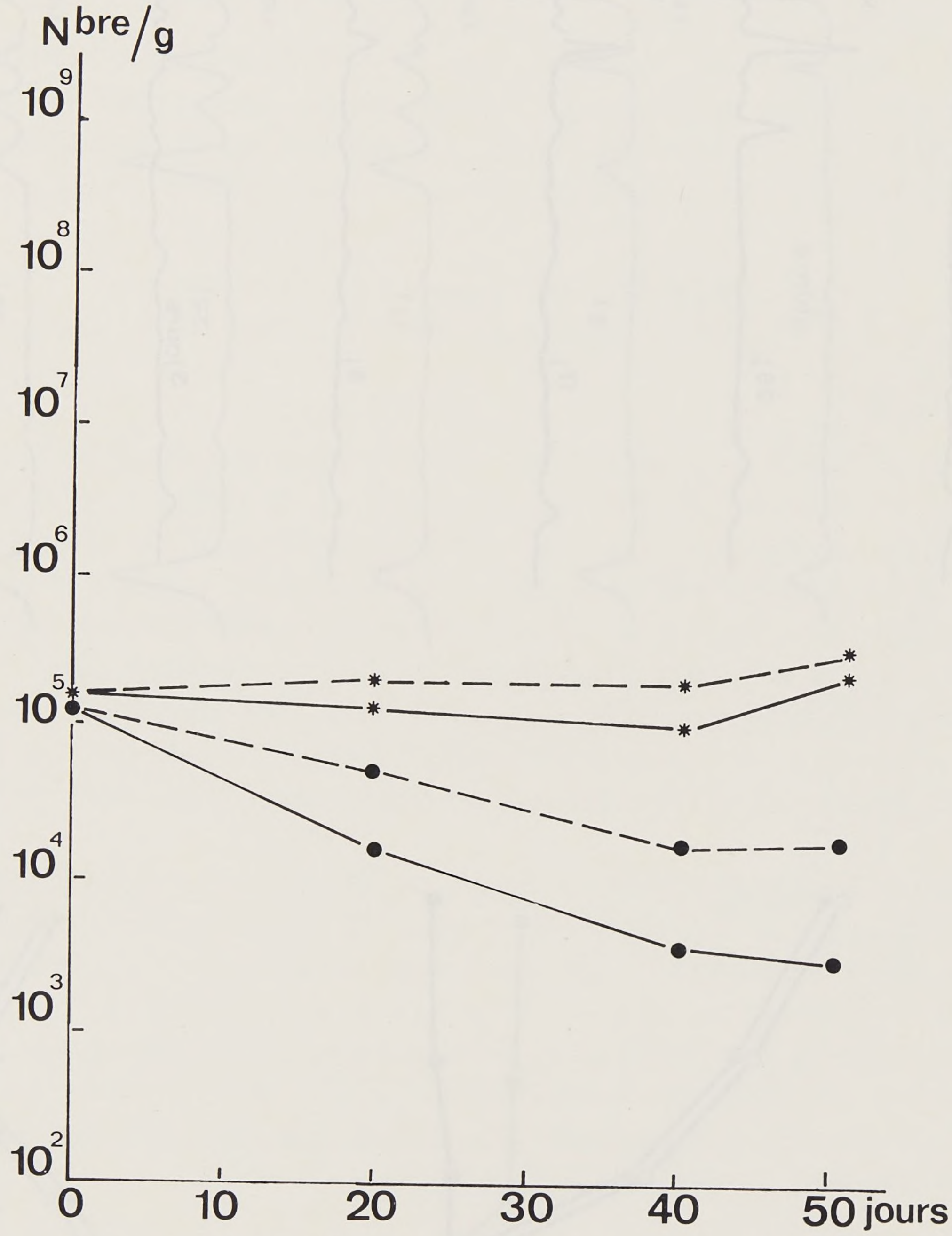


FIG. 9. — *Maïs-grain stocké à une teneur en eau de 15 p. 100*
Évolution de la microflore

– à 22°C : ● ——— ● Bactéries ; * ——— * Mycoflore de stockage ;
– à 5°C : ● – – – ● Bactéries ; * – – – * Mycoflore de stockage.

Pendant toute la durée de cet essai, soit 50 jours, la fraction volatile ne présente aucune évolution notable, aux deux températures étudiées (fig. 10).

Il convient de signaler le niveau plus élevé de la mycoflore des grains au départ.

Les espèces fongiques qui constituent l'essentiel de cette flore initiale appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* qui, bien qu'assez fréquents, ne se rencontrent qu'en très faible quantité sur les grains à la récolte (QASEM et CHRISTENSEN, 1958 ; TUITE, 1961 ; POISSON et CAHAGNIER, 1973). Leur abondance relative sur les grains étudiés ici, par rapport aux grains témoins des expériences précédentes, permet de supposer un début d'altération au cours du séchage lent mis en œuvre.

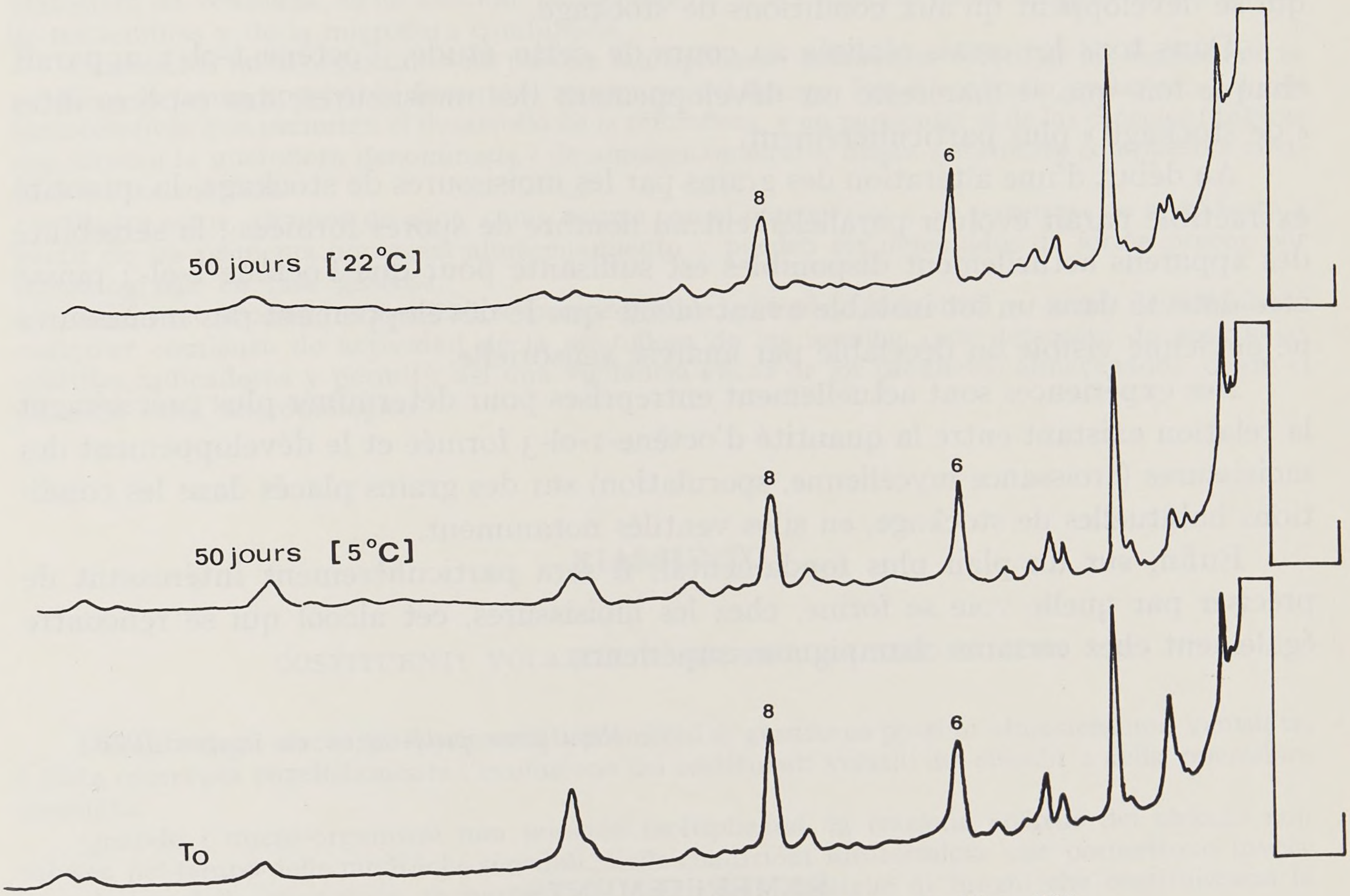


FIG. 10. — *Maïs-grain stocké à une teneur en eau de 15 p. 100*
Évolution des constituants volatils à 22°C et 5°C

Au niveau de la fraction volatile, malgré le séchage, ce début d'altération se traduit notamment par la présence d'octène-1-ol-3 (pic nº 8) et il serait intéressant de déterminer, en fonction des modalités du séchage, dans quelle mesure l'analyse des constituants volatils d'un lot de grains permet d'évaluer son « histoire microbiologique ». A la mise en expérience, ces grains ne présentent pas d'odeur de « moisi » caractéristique, mais peuvent cependant, après broyage et léger chauffage, être distingués par leurs caractères olfactifs des grains témoins précédemment examinés.

CONCLUSIONS

Des résultats de cette étude préliminaire, un certain nombre de points peuvent être dégagés.

D'une manière générale, la prolifération des micro-organismes associés aux grains stockés en atmosphère non renouvelée s'accompagne toujours de la forma-

tion de substances volatiles parmi lesquelles certaines, par leurs caractères olfactifs marqués, modifient notablement l'odeur des grains.

Inversement, dans les conditions de stockage étudiées, à la stabilité microbiologique correspond une stabilité de la fraction volatile des grains.

Les substances formées varient, qualitativement et quantitativement, suivant les conditions hydrothermiques de stockage et des travaux complémentaires devraient permettre de préciser si ces variations tiennent plus à la nature des micro-organismes qui se développent qu'aux conditions de stockage.

Dans tous les essais réalisés au cours de cette étude, l'octène-1-ol-3 apparaît chaque fois que se manifeste un développement des moisissures, des espèces dites « de stockage » plus particulièrement.

Au début d'une altération des grains par les moisissures de stockage, la quantité extractible paraît évoluer parallèlement au nombre de spores formées ; la sensibilité des appareils actuellement disponibles est suffisante pour que l'octène-1-ol-3 puisse être détecté dans un lot instable avant même que le développement des moisissures ne devienne visible ou décelable par analyse sensorielle.

Des expériences sont actuellement entreprises pour déterminer plus précisément la relation existant entre la quantité d'octène-1-ol-3 formée et le développement des moisissures (croissance mycélienne, sporulation) sur des grains placés dans les conditions habituelles de stockage, en silos ventilés notamment.

Enfin, sur un plan plus fondamental, il sera particulièrement intéressant de préciser par quelle voie se forme, chez les moisissures, cet alcool qui se rencontre également chez certains champignons supérieurs.

Reçu pour publication en janvier 1976.

REMERCIEMENTS

Nous remercions P. Dubois, de la Station de Technologie des Produits végétaux de l'I.N.R.A., Dijon, pour les déterminations qu'il a effectuées par spectrométrie de masse.

SUMMARY

VOLATILE COMPOUNDS AND GRAIN MICROFLORA

During experimental storages of maize grains under airtight conditions the evolution of the grain volatile compounds and that of the associated microflora have been studied simultaneously.

When microorganisme cannot develop the grain volatile fraction does not change considerably in time. On the contrary under the hydrothermal conditions which allow the growth of microflora especially that of fungal species forming the « storage » mycoflora volatile compounds are produced in grains.

Some of these compounds as for instance the 1-octen-3 ol appear already during the first hours of storage and may be detected early through gas chromatography.

These first results let suppose that at an industrial level it might be possible to detect the very first activity of the grain microflora through the detection of the indicatory volatile substances and to check efficiently the stocks at the microbiological level.

RESUMEN

COMPONENTES VOLATILES Y MICROFLORA DE LAS SEMILLAS

Durante el transcurso de almacenamientos exprimentales de semillas de maíz dispuestas en atmósfera no ventilada, se ha asistido, paralelamente, a la evolución de los componentes volátiles de las semillas y de la microflora combinada.

Cuando los microorganismos no pueden multiplicarse, la fracción volátil de las semillas no se modifica de forma apreciable durante el transcurso del tiempo. Por el contrario, en las condiciones hidrotérmicas que permiten el desarrollo de la microflora, y en particular el de las especies fúngicas que forman la microflora denominada « de almacenamiento », llegan a formarse compuestos volátiles en las semillas.

Entre estos, algunos de ellos, como ocurre con el octeno 1-ol-3, se ponen ya de manifiesto a partir de las primeras horas del almacenamiento y pueden ser detectados de forma precoz por cromatografía en fase gaseosa.

Según estos primeros resultados, parece posible — a nivel industrial — poner de manifiesto cualquier comienzo de actividad de la microflora de las semillas, por detección de sustancias volátiles indicadoras y permitir así una vigilancia eficaz de los productos almacenados, desde el pinto de vista microbiológico.

RIASSUNTO

COSTITUENTI VOLATILI E MICROFLORA DEI CHICCHI

Durante degli stoccaggi sperimentali di chicchi di granturco posti in atmosfera non ventilata, è stata osservata parallelamente l'evoluzione dei costituenti volatili dei chicchi e della microflora associata.

Quando i micro-organismi non possono moltiplicarsi, la frazione volatile dei chicchi non subisce nel tempo delle modifiche sensibili. Nelle condizioni idrotermiche che permettono invece lo sviluppo della microflora, in particolare quello delle famiglie di funghi che costituiscono la micoflora detta di « stoccaggio », si formano nei chicchi dei composti volatili.

Tra questi composti volatili, alcuni, quali l'ottene-1-ol-3, appaiono sin dalle prime ore di stoccaggio e possono essere scoperti precocemente mediante gas-cromatografia.

In considerazione di questi primi risultati, appare possibile, sul piano industriale, di trovare qualsiasi inizio d'attività della microflora dei chicchi mediante scoperta di sostanze volatili indicatrici e assicurare cosí un controllo efficace degli stock dal punto di vista microbiologico.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANONYME, 1971. Le maïs-grain : Préstockage, séchage et qualité. Discussion générale des principaux résultats. *Ann. Zootechn.*, **20** (n° hors-série), 697-705.

CAHAGNIER B., 1971. *La microflore du maïs-grain humide.* Mémoire présenté au C.N.A.M. (Ingénieur DPE), Paris.

GUILBOT A., 1969. *Dosage de l'eau dans le maïs humide.* Méthode proposée à l'I.C.C. pour normalisation. Réunion de Paris, mars.

HOFFMANN G., 1962. Octen-1-ol-3 and its relations to other oxidative cleavage products from esters of linoleic acid. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **39**, 439-444.

HOUGEN W. F., QUILLIAM M. A., CURRAN W. A., 1971. Head-space vapors from cereal grains. *J. Agr. Food. Chem.*, **19**, 182-183.

KAMINSKI E., STAWICKI S., WASOWICZ E., PRZYBYLSKI R., 1973. Detection of deterioration of grain by gas-chromatography. *Ann. Technol. agr.*, (n° hors-série), 261-267.

KAMINSKI E., STAWICKI S., WASOWICZ E., 1974. Volatile flavor compounds produced by molds of Aspergillus, Penicillium and Fungi imperfecti. *Appl. Microbiol.*, **27** (6), 1001-1004.

KRETOVITCH V. L., PROKHOROVA A. P., 1960. Caractéristiques biochimiques de graines ayant différentes odeurs. *Nouvelles de l'Académie des Sciences de l'U.R.S.S.*, sér. B, 446-450.

LAGRANDEUR G., POISSON J., 1968. La microflore du maïs, son évolution en fonction des conditions hydriques et thermiques de stockage en atmosphère renouvelée. *Ind. Alim. Agr.*, **6-7**, 775-788.

MCWILLIAMS M., MACKEY A. C., 1969. Wheat flavour components. *J. Food Sc.*, **34**, 493-496.

MULTON J.-L., POISSON J., GUILBOT A., 1969. Les altérations du grain de blé après la récolte. *Bull. Techn. Inf.* (244).

PARSONS A. M., 1973. *Influence of lipid oxidation on quality of lipid-containing food products.* IIIe S.T.O.L., I.T.E.R.G., Paris.

POISSON J., CAHAGNIER B., 1972. Aspect microbiologique de la conservation du maïs-grain humide par l'acide propionique. *Ann. Technol. agric.*, **21** (2), 99-122.

POISSON J., CAHAGNIER B., 1973. La microflore des grains de maïs humides. Composition et évolution en fonction de divers modes de stockage. *Rev. Mycol.*, **38**.

QASEM S. A., CHRISTENSEN C. M., 1958. Influence of moisture content, temperature and time on the deterioration of stored corn by fungi. *Phytopathology*, **48**, 544-549.

RICHARD-MOLARD D., DRAPRON R., 1975. Extraction et concentration des constituants volatils des grains, en vue de leur analyse par chromatographie en phase gazeuse. *Ann. Technol. agric.*, **2** (1), 65-74.

TUITE J.-F., 1961. Fungi isolated from unstored corn seed in Indiana in 1956-1958. *Plant Disease Reporter*, **5**, 212-215.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (1), 45-72.

MÉTABOLISME ANAÉROBIE DE LA BAIE DE RAISIN EN MILIEU LIQUIDE

II. — ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

M. BURET, Y. CHAMBROY et C. FLANZY

avec la collaboration technique de Geneviève MIGLIORI, Sylvie LARA et M. TACCHINI

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,
84140 Montfavet

RÉSUMÉ

L'existence d'un métabolisme anaérobie (MA) dans des baies de raisin immergées dans un milieu liquide est mise en évidence. Le MA en milieu liquide est comparé au MA en milieu gazeux. Deux techniques expérimentales sont utilisées : l'une fait appel à des temps de contact entre baies et solution relativement longs (8 jours) ; l'autre, qui comprend deux étapes, permet de mesurer l'influence d'un prétraitement de courte durée (2 jours) sur l'intensité du MA.

La production d'éthanol et le catabolisme du malate (phénomènes caractéristiques du MA en milieu gazeux) sont généralement atténués dans le milieu liquide, alors que l'extraction des polyphénols totaux en est accrue. En ce milieu, le MA s'accompagne de processus d'échanges de substances entre les baies et la solution.

En outre, l'existence d'une désorganisation progressive et irréversible des cellules de la baie au cours du MA, quel que soit le milieu générateur de l'anaérobiose, est soupçonnée. Un compartimentage de l'éthanol et du malate dans la baie est mis en évidence. Enfin il semble qu'une activation (ou une synthèse) de certaines enzymes impliquées dans ce métabolisme soit favorisée par une haute température.

Quelques orientations (séparation-baies, jus de goutte, remontages), au niveau de la conduite d'une vinification par macération carbonique, sont dégagées.

Mots clés : *métabolisme anaérobie, raisin, macération carbonique, diffusion, compartiments.*

I. — INTRODUCTION

Pendant la première phase de la vinification par macération carbonique (MC), une proportion relativement importante de baies entières de raisin baigne dans le jus des baies qui ont éclaté lors de l'encuvage et au cours du tassement de la ven-

dange. Ce jus subit une fermentation alcoolique classique par les levures. Des essais de vinification (BENARD *et al.*, 1971 *a, b*) ont montré que les interactions baies entières et jus en fermentation pouvaient influer sur la qualité des vins obtenus. Une étude du métabolisme anaérobie (MA) de baies de raisin plongées dans un milieu liquide bien défini a été entreprise dans le but d'améliorer notre connaissance de ce métabolisme et de mieux maîtriser la technique de vinification par MC.

Le mémoire actuel correspond à une interprétation synthétique des résultats obtenus en 10 ans d'expérimentation. L'ordre d'exposition des faits et des idées tel qu'il apparaît dans le texte ne correspond pas toujours à la suite chronologique des manipulations. C'est ainsi que telle observation fondamentale mise en évidence dans des conditions de milieu très étudiées peut être présentée avant les résultats d'essais antérieurs conduits en solutions plus simples.

2. — MÉTHODE ET TECHNIQUE EXPÉRIMENTALES

Nous rappelons dans ce paragraphe les définitions indispensables à la compréhension du mémoire. Elles ont été explicitées d'une manière plus complète dans une autre publication (BURET, CHAMBROY, FLANZY, 1975).

2. 1. — *Méthode expérimentale*

2. 1.1. *Préliminaires.*

Si des baies sont plongées dans un milieu aussi complexe que du jus de raisin en fermentation, l'ensemble des facteurs mis en jeu rend délicate l'interprétation des résultats expérimentaux. Nous avons donc choisi de travailler initialement dans un milieu simple (eau distillée par exemple). Ce milieu est modifié progressivement au cours de l'expérimentation pour tendre progressivement vers la composition d'un jus de raisin en fermentation.

Nous nous sommes appuyés sur les résultats obtenus lors de l'étude du MA de baies de raisin soumises à une anaérobiose gazeuse pour choisir les deux critères suivants qui nous permettent de caractériser ce métabolisme : la production d'éthanol d'une part, le catabolisme de l'acide malique d'autre part.

L'éthanol correspond au type de substance qui est synthétisée dans la baie. L'acide malique caractérise les substances qui existent dans la baie et qui sont partiellement ou totalement transformées pendant le MA. Nous avons associé à l'étude de ces deux substrats celle des sucres réducteurs et des polyphénols totaux qui constituent des substances importantes lors de la vinification du raisin et de l'élaboration d'un vin. Les évolutions de ces 4 substances au cours du MA en milieu liquide ont été suivies à 3 températures (15°C, 25°C et 35°C).

Au cours de cette étude, tous les milieux liquides sont amenés au pH du moût.

2. 1.2. *Protocole expérimental.*

Deux types de manipulation ont été réalisés :

1er type : manipulation de longue durée.

Les baies sont plongées dans un milieu liquide. Les prélèvements peuvent être effectués à intervalles de temps déterminés ; des cinétiques des processus étudiés sont ainsi obtenues. Les prélèvements peuvent également être réalisés au bout d'un temps identique pour tous les lots. Cette technique permet de dresser des bilans de l'action de milieux de compositions différentes.

2e *type : manipulation avec prétraitement.*

Des lots de baies sont placés pendant un temps relativement court dans des conditions expérimentales variables, mais bien définies (température, milieu liquide). Les différences de

MA : Métabolisme anaérobie.
MC : Macération carbonique.

MA entre lots, non mesurables pour ce temps d'expérimentation, sont révélées par la suite en plaçant tous les lots dans un milieu anaérobie identique dont la composition assure une bonne conservation des baies.

2. 1.3. *Expression et interprétation des résultats.*

Définitions.

Moût : c'est le jus de raisin obtenu après pressurage des baies. Nous appelons *m* la concentration d'une substance par litre de moût et M la quantité de cette substance contenue dans 1 000 g de raisin.

Solution : c'est le milieu liquide dans lequel les baies sont plongées. Nous appelons *e* la concentration d'une substance dans la solution et S la quantité de substance qui se trouve dans le volume de solution utilisé pour 1 000 g de raisin mis en œuvre.

Concentrations et quantités sont exprimées en mg (1) (éthanol, ac. gallique), g (1) (sucres réducteurs), meq (1) (ac. malique) respectivement par litre et pour 1 000 g de raisin mis en œuvre.

Critères d'interprétation des processus d'échange de substances entre les baies et la solution.

Pourcentage de diffusion.

$$D = \frac{S}{M + S} \times 100$$

C'est le rapport de la quantité d'une substance dans la solution (S) à la quantité totale (M + S) de la substance dans le moût (M) et la solution.

Coefficients d'accroissements de l'extraction des polyphénols

$$Cac = \frac{\text{quantité de polyphénols extraite au cours du MA}}{\text{quantité initiale de polyphénols contenue dans le moût du lot de départ}}.$$

En milieu liquide, C*ac* peut être calculé soit à partir de la quantité totale extraite (M + S), soit seulement à partir de la quantité (M) extraite dans le moût des baies. Il mesure alors l'efficacité de l'extraction en milieu liquide au niveau du moût seulement.

$$C_{CO_2} = \frac{\text{Quantité de polyphénols extraite au cours du MA en milieu liquide}}{\text{Quantité de polyphénols extraite au cours du MA en milieu } CO_2}.$$

Cet indice permet de comparer l'efficacité de l'extraction dans différents milieux liquides par rapport à un témoin placé en anaérobiose carbonique.

Équilibre de diffusion.

Nous admettons qu'un équilibre de diffusion est atteint si la concentration (*e*) d'une substance reste constante dans la solution. Le rapport constitue un indice qui caractérise cet équilibre.

Critères de mesures des modifications de l'intensité du MA.

Pour toute substance du métabolisme, nous appelons (I_1) l'inhibition globale créée par le milieu liquide par rapport à un témoin gazeux.

$$I_1 = \frac{\text{différence entre l'évolution de la substance en milieu gazeux et en milieu liquide}}{\text{évolution de la substance en milieu gazeux}} \times 100$$

soit

$$I_1 = \frac{X - Y}{X} \times 100 = \left(1 - \frac{Y}{X}\right) 100.$$

Dans le cas de substances métaboliques qui existent dans la baie et qui sont plus ou moins dégradées pendant le MA, I_1 peut être la somme de deux inhibitions ($I_1 = I_2 + I_3$).

I_2 : mesure l'action de la solution sur l'activité métabolique des baies,
I_3 : mesure l'influence de la diffusion de la substance sur l'inhibition totale I_1 pour des baies soumises à une inhibition I_2.

(1) mg : milligramme, g : gramme, meq : milliéquivalent.

2. 2. — *Techniques expérimentales*

2. 2.1. *Échantillonnage.*

Les lots de raisin ont été constitués en appliquant la technique d'échantillonnage, décrite par FLANZY C. *et al.* (1969), au cours de l'étude du MA en anaérobiose gazeuse. Cependant, la taille des enceintes expérimentales nous a contraint à réduire par lot le nombre de baies de 350 à 200 $\pm$ 2.

L'hétérogénéité entre les lots obtenus provient de la réduction de leur taille. Une autre cause de variabilité des échantillons peut être attribuée aux critères de choix des baies. L'échantillonnage repose sur trois critères : maturité apparente, taille et état sanitaire des baies. Ceux-ci peuvent être suffisants et donner satisfaction dans le cas de l'étude du MA en phase gazeuse. Par contre, en phase liquide, des contraintes supplémentaires s'exercent sur les baies (pression osmotique de la solution, échanges de substances entre les baies et la solution par exemple). La variabilité des baies constituant les lots peut être plus importante vis-à-vis de ces nouvelles conditions imposées par le milieu.

Le plus souvent, nous avons effectué des répétitions de lots à partir du même matériel végétal. Les mesures effectuées permettent en général de repérer et d'exclure des lots ayant un comportement aberrant. Nous avons effectué aussi des répétitions de manipulation. Celles-ci sont nécessairement réalisées sur un matériel végétal d'origine variable. L'ampleur des phénomènes peut varier d'un essai à l'autre pour des causes de nature biologique. Dans ces conditions, une mesure quantitative absolue du processus observé est délicate. Cependant, par analogie d'un essai à l'autre, une tendance suffisante pour caractériser l'effet étudié peut être dégagée.

2. 2.2. *Préparation des lots de baies.*

Si aucun traitement préalable ne bloque l'activité des micro-organismes présents à la surface des baies avant leur immersion dans le milieu liquide, un développement considérable de levures intervient en quelques jours d'expérimentation. Le traitement recherché doit donc empêcher ce développement mais être sans influence sur le MA.

Le trempage des lots dans des solutions d'antiseptiques ou de détergents conduit à un échec. En revanche, des doses variables de métabisulfite de potassium (200 à 400 mg/l) dans la solution expérimentale initiale (eau) permettent dans une large mesure d'éviter le développement des micro-organismes. Cependant, un tel procédé provoque une inhibition plus ou moins forte de la production d'éthanol lors d'une anaérobiose.

2. 2.3. *Analyses effectuées.*

Éthanol.

L'éthanol est dosé par la méthode de l'oxydation chromique (FLANZY M. *et al.*, 1969).

Acide malique.

L'acide malique est mesuré au spectrophotomètre par oxydation en oxaloacétate hydrazone par la malate déhydrogénase en tampon glycine-hydrazine. Nous savons que les différentes substances ajoutées au cours de notre travail aux solutions expérimentales ne modifient pas sensiblement l'activité de l'enzyme (POUX, 1969).

Sucres réducteurs.

Ils sont dosés par la méthode de Bertrand.

Polyphénols totaux.

Les polyphénols sont évalués par réduction de l'acide phosphotungstomolybdique en solution alcaline (réactif de Folin-Denis) et exprimés en mg d'acide gallique par référence à une courbe étalon (PRO, 1952).

Examen microbiologique des solutions.

Le contrôle de l'absence de développement de micro-organismes dans les solutions est effectué avec un microscope à contraste de phase au grossissement $\times$ 400.

3. — RÉSULTATS

3. 1. — *Aspects quantitatifs du MA en milieu liquide*

3. 1.1. *Préliminaire.*

Lorsque des baies de raisin entières sont plongées dans une solution (glucose, 200 g/l ; SO_2, 150 mg/l) à 35 °C, une production d'éthanol et une dégradation partielle du malate se manifestent (fig. 1). L'intensité de ces deux processus est atténuée par rapport à celle obtenue dans des lots de baies homologues soumis à une anaérobiose carbonique. Cette diminution d'intensité apparaît brutalement vers le quatrième jour d'anaérobiose.

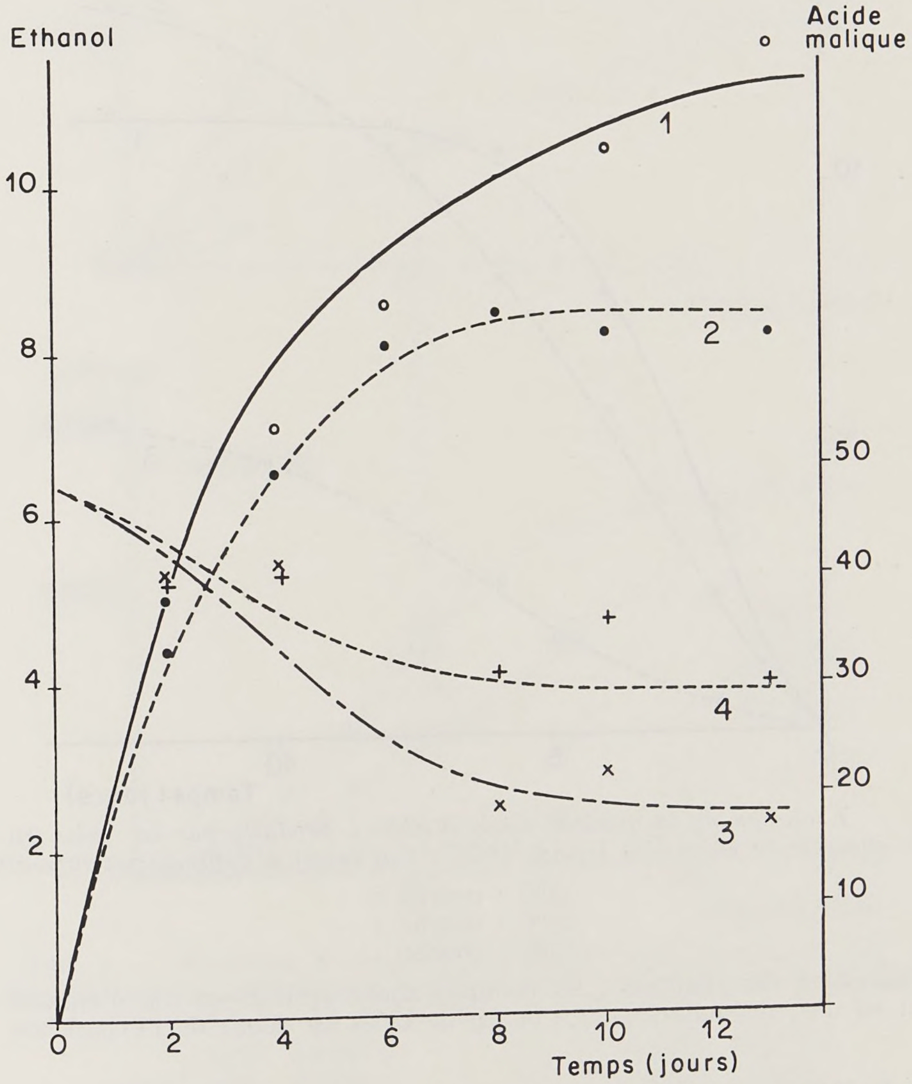


Fig. 1. — *Production d'éthanol et catabolisme du malate : comparaison de leurs évolutions en anaérobiose gazeuse* (CO_2) *et en anaérobiose liquide* (eau, SO_2 : 150 mg/l, glucose : 200 g/l) *à 35 °C*

Anaérobiose gazeuse { évolution de l'éthanol 1 ; évolution du malate 3

Anaérobiose liquide { évolution de l'éthanol 2 ; évolution du malate 4

Expression des résultats : les résultats sont exprimés en mg d'éthanol et en meq de malate pour 1 000 g de baies au début de l'expérience

3. 1.2. *Production d'éthanol en fonction de la température, par des baies de raisin soumises à une anaérobiose en milieu liquide en présence de SO_2* (150 mg/l)

Production totale (fig. 2).

Dans une première phase, longue à 15°C, brève à 25°C et 35°C, la vitesse de synthèse de l'éthanol par les baies s'accélère. Elle reste relativement constante pendant 4 jours à 35°C et 8 jours à 25°C, puis s'annule d'autant plus rapidement que la température est élevée (sixième, septième jour à 35°C et treizième ou quinzième jour à 25°C). Ainsi, la production maximale observée à 25°C (13 800 mg) peut être supérieure à celle mesurée à 35°C (11 800 mg) malgré une vitesse de production inférieure dans les premiers jours.

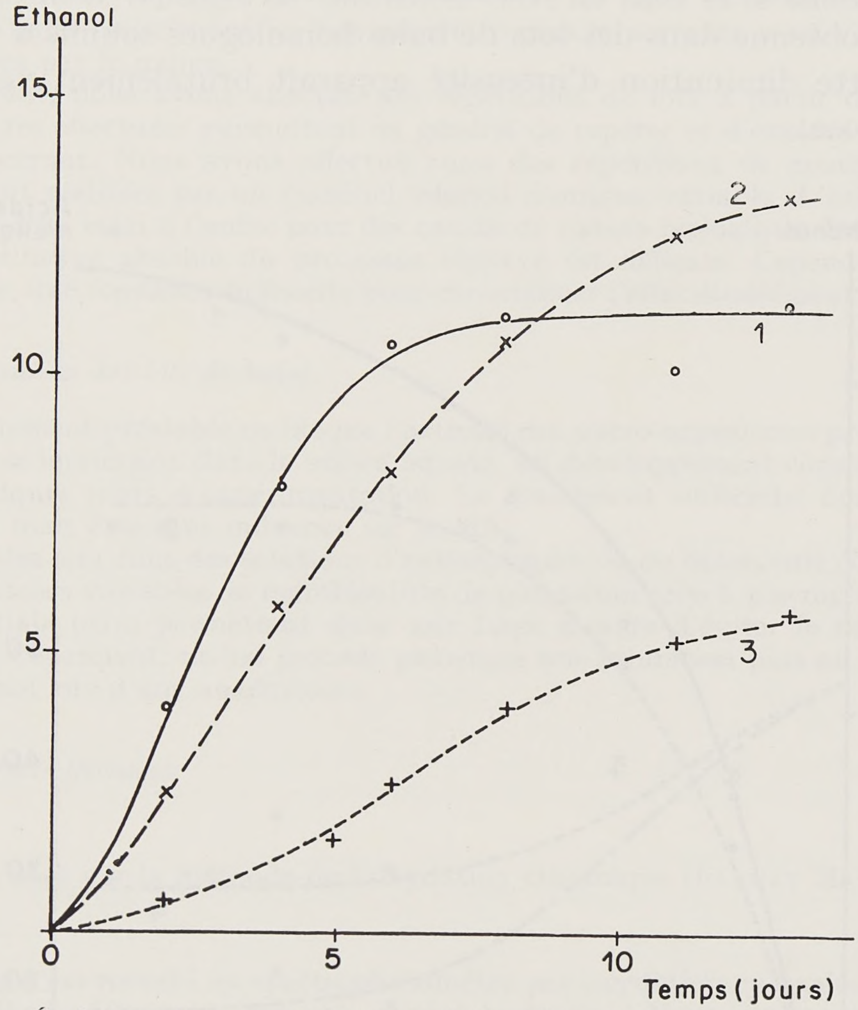


FIG. 2. — *Évolution de la quantité totale d'éthanol produite par les baies au cours d'une anaérobiose en milieu liquide* (SO_2 : 150 mg/l) *à différentes températures*

35°C : courbe 1
25°C : courbe 2
15°C : courbe 3

Expression des résultats : les résultats sont exprimés en mg d'éthanol et en meq de malate pour 1 000 g de baies au début de l'expérience

Diffusion de l'éthanol produit par les baies (fig. 3).

Dans le moût, la quantité d'éthanol passe par un maximum qui précède de quelques jours (un à deux jours à 35°C, trois à cinq jours à 25°C) la fin de sa production. Au cours du MA, une partie de l'éthanol produit par les baies migre dans la solution qui les baigne. La quantité d'éthanol qui diffuse à partir du moût s'accroît et tend vers une valeur limite atteinte après la fin de la synthèse de l'éthanol par les baies (deux jours à 35°C).

Le pourcentage de diffusion D rejoint, à 35°C, une valeur maximale voisine de 60 p. 100 en dix jours dans nos conditions expérimentales (volume de solution = 400 ml ; poids de raisin = 270 g). A 25°C, par extrapolation, la même valeur serait atteinte après 15 jours d'anaérobiose.

La pente des courbes de diffusion permet la mesure de la vitesse de ce phénomène. Les premiers jours d'anaérobiose, cette vitesse semble davantage liée à la température qu'à une différence de concentration de l'éthanol entre moût et solution. En effet, pour une teneur du moût identique aux deux températures (35°C et 25°C), nous observons une différence de concentration moût-solution plus importante à 25°C ; la vitesse de diffusion reste néanmoins supérieure à 35°C.

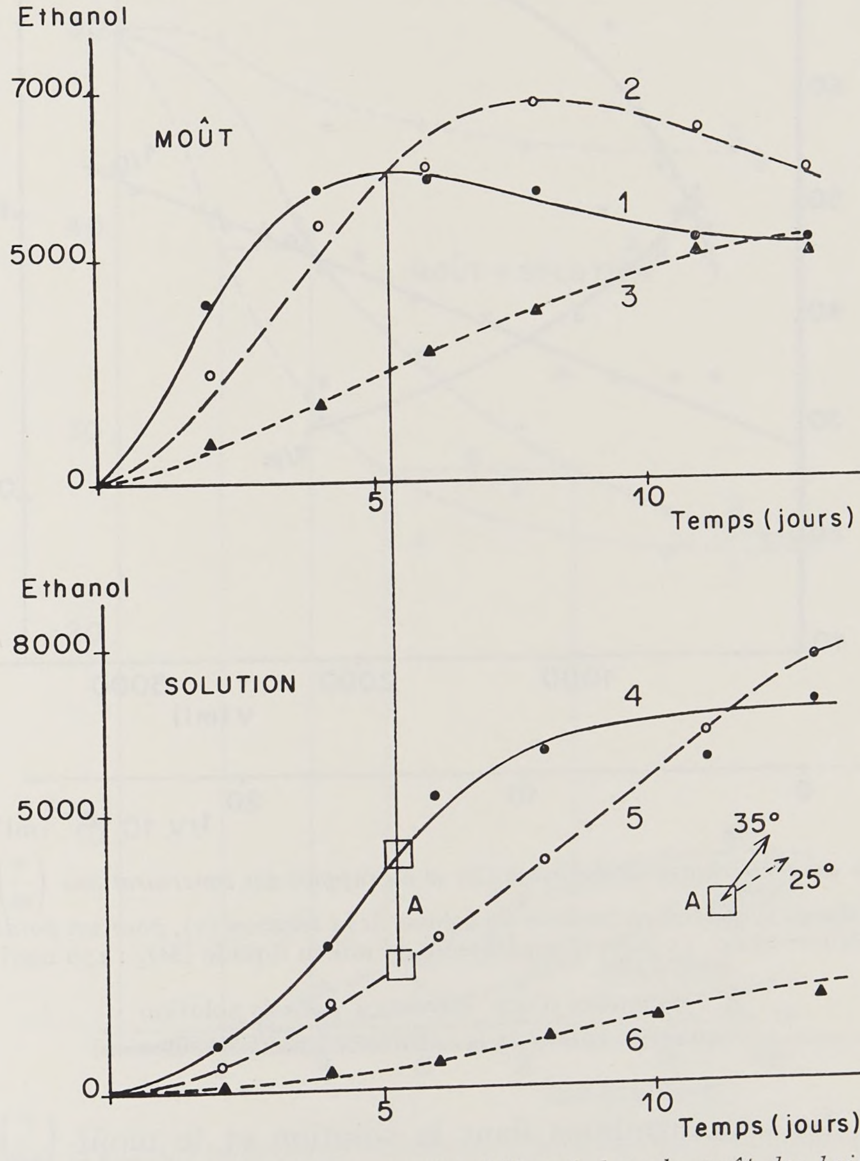


FIG. 3. — *Évolution de la quantité d'éthanol dans le moût des baies et dans la solution environnante au cours d'une anaérobiose en milieu liquide* (SO_2 : 150 mg/l) *à différentes températures*

moût { 35°C courbe 1 ; 25°C courbe 2 ; 15°C courbe 3 } solution { 35°C courbe 4 ; 25°C courbe 5 ; 15°C courbe 6 }

Expression des résultats : les résultats sont exprimés en mg d'éthanol et en meq de malate pour 1 000 g de baies au début de l'expérience

Équilibre de diffusion.

A 35°C en milieu SO_2 (1) (150 mg/l), un équilibre de diffusion semble être atteint vers le dixième jour (fig. 3). Dans un milieu (SO_2 = 150 mg/l, glucose = 200 g/l),

(1) Milieu SO_2 = solution de métabisulfite de potassium.

à l'équilibre, pour un poids de baies constant, le pourcentage de diffusion croît avec le volume de la solution (fig. 4). La détermination par extrapolation de D pour un volume de solution infini est très imprécise. Il semble cependant que D tende vers une limite inférieure à 100.

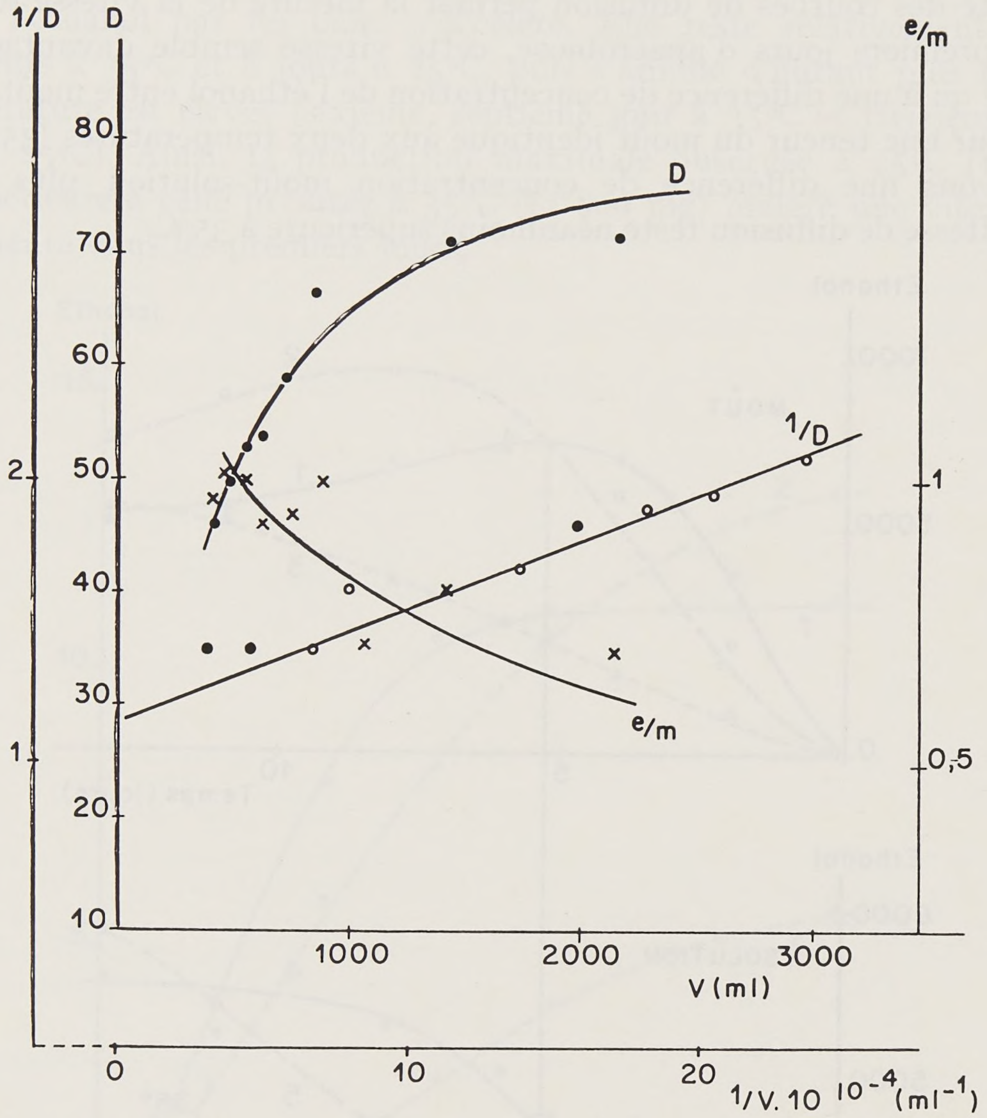


FIG. 4. — *Évolution du pourcentage de diffusion* (D) *et du rapport des concentrations* $\left(\frac{e}{m}\right)$, *dans la solution et le moût, de l'éthanol synthétisé en fonction du volume de la solution* (v), *pour un poids de baies constan*
Conditions expérimentales : 15 jours d'anaérobiose en milieu liquide (SO_2 : 150 mg/l, glucose : 200 g/l) à 35°C.

$$D = \frac{\text{quantité d'une substance dans la solution}}{\text{quantité totale de la substance (moût + solution)}}$$

Le rapport des concentrations dans la solution et le moût $\left(\frac{e}{m}\right)$ à l'équilibre n'est pas indépendant du volume de la solution ; il diminue quand celui-ci s'accroît.

Entre D et le volume de la solution V, il existe une relation d'allure hyperbolique. En coordonnées inverses $\frac{1}{D}$ fonction de $\frac{1}{V}$, nous obtenons une relation approximativement linéaire. Cependant, les points expérimentaux obtenus pour des volumes importants de la solution s'écartent systématiquement de la droite obtenue. En première approximation, la production d'éthanol étant de 10 200 mg, une quantité M_2 = 9 500 mg pourrait être attribuée à un compartiment de la baie en équilibre avec la solution et une quantité M_1 = 670 mg à un autre compartiment du raisin, relativement indépendant du milieu ambiant.

3. 1.3. *Catabolisme du malate, en fonction de la température, par des baies de raisin soumises à une anaérobiose en milieu liquide en présence de SO_2* (150 mg/l).

Dégradation totale (fig. 5).

Le catabolisme du malate est d'autant plus rapide que la température est élevée. A 15 °C, ce processus reste limité dans nos conditions expérimentales. L'accroissement de vitesse du phénomène, dans un premier temps, est nettement visible à 25 °C. La vitesse se stabilise ensuite avant de se ralentir pour s'annuler vers le huitième jour à 35 °C et le douzième jour à 25 °C.

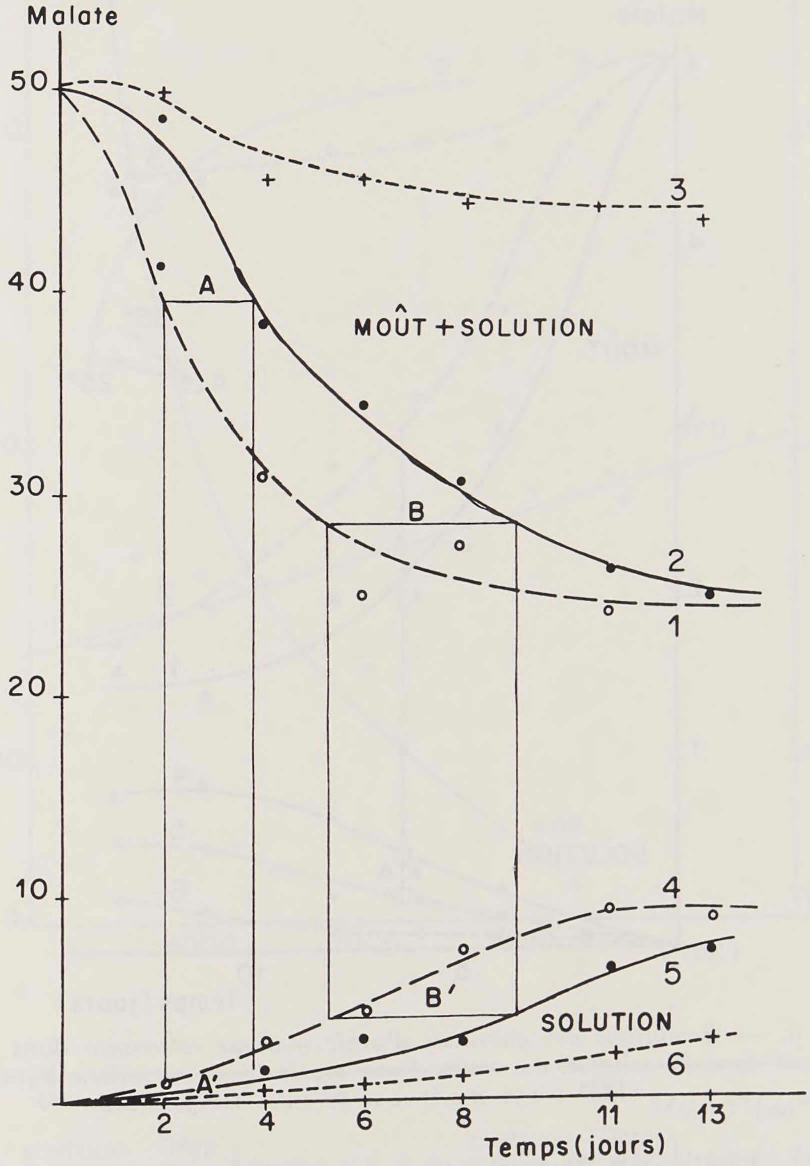


FIG. 5. — *Évolution de la quantité totale* (moût + solution) *d'acide malique non dégradé et de la quantité ayant diffusé dans la solution au cours d'une anaérobiose en milieu liquide* (SO_2 : 150 mg/l) *à différentes températures.*

moût { 35 °C courbe 1 ; 25 °C courbe 2 ; 15 °C courbe 3 }
solution { 35 °C courbe 4 ; 25 °C courbe 5 ; 15 °C courbe 6 }

AA′ et BB′ : comparaisons des quantités diffusées et non dégradées à 25 °C et 35 °C. Expression des résultats : les résultats sont exprimés en mg d'éthanol et en meq de malate pour 1 000 g de baies au début de l'expérience.

La durée du catabolisme à 35 °C et 25 °C est voisine de celle observée pour la synthèse de l'éthanol. A ces températures, aux huitième et douzième jours, 50 p. 100 environ du malate initialement présent dans les baies sont dégradés.

Diffusion du malate présent dans les baies (fig. 6).

Tandis qu'une partie du malate est métabolisée dans les baies, une quantité non négligeable diffuse du moût dans la solution. Le processus est d'autant plus important et rapide que la température est élevée.

La quantité de malate qui passe dans la solution atteint une valeur maximale vers le dixième jour à 35°C peu de temps après la fin du catabolisme de cet acide. A ce moment, le pourcentage de diffusion D est égal à 40 p. 100. Par extrapolation, une valeur voisine est obtenue entre quinze et vingt jours à 25°C.

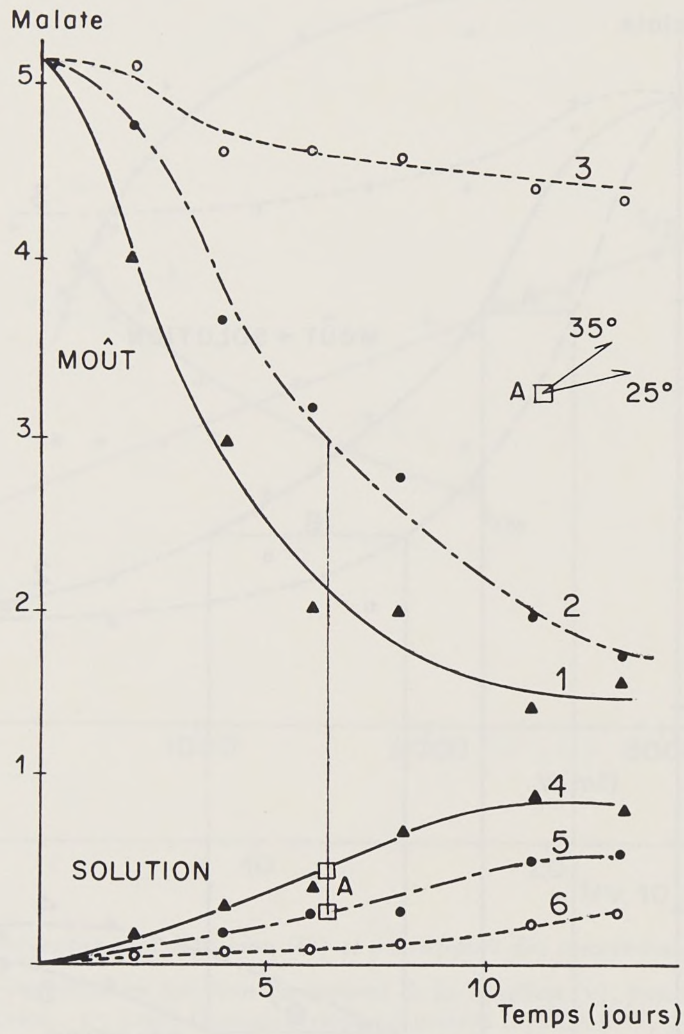


FIG. 6. — *Évolutions des quantités d'acide malique retrouvées dans le moût et dans la solution au cours d'une anaérobiose en milieu liquide* (SO^2 : 150 mg/l) *à différentes températures*

moût	35°C	courbe 1	solution	35°C	courbe 4
	25°C	courbe 2		25°C	courbe 5
	15°C	courbe 3		15°C	courbe 6

A : comparaison de la vitesse de diffusion dans la solution, à 25°C et 35°C.
Expression des résultats : les résultats sont exprimés en milliéquivalents de malate pour 1 000 g de baies au début de l'expérience

La vitesse de la diffusion, mesurée par les pentes des courbes de diffusion du malate dans la solution, est fonction de la température. En revanche, la quantité de malate qui diffuse dans la solution semble liée à la quantité totale de malate présent dans le milieu (fig. 5). En effet, à 35°C et 25°C, pour des durées d'anaérobiose différentes, nous retrouvons la même teneur de malate dans la solution lorsque les quantités totales (moût + solution) sont égales.

Équilibre de diffusion.

A 35°C, un équilibre de diffusion est atteint après 10 jours d'anaérobiose. Dans ces conditions, pour un poids de baies constant, le pourcentage de diffusion croît avec le volume de la solution. Bien qu'imprécise, la détermination de D pour un volume de solution V infini semble conduire à une valeur inférieure à 100 (fig. 7).

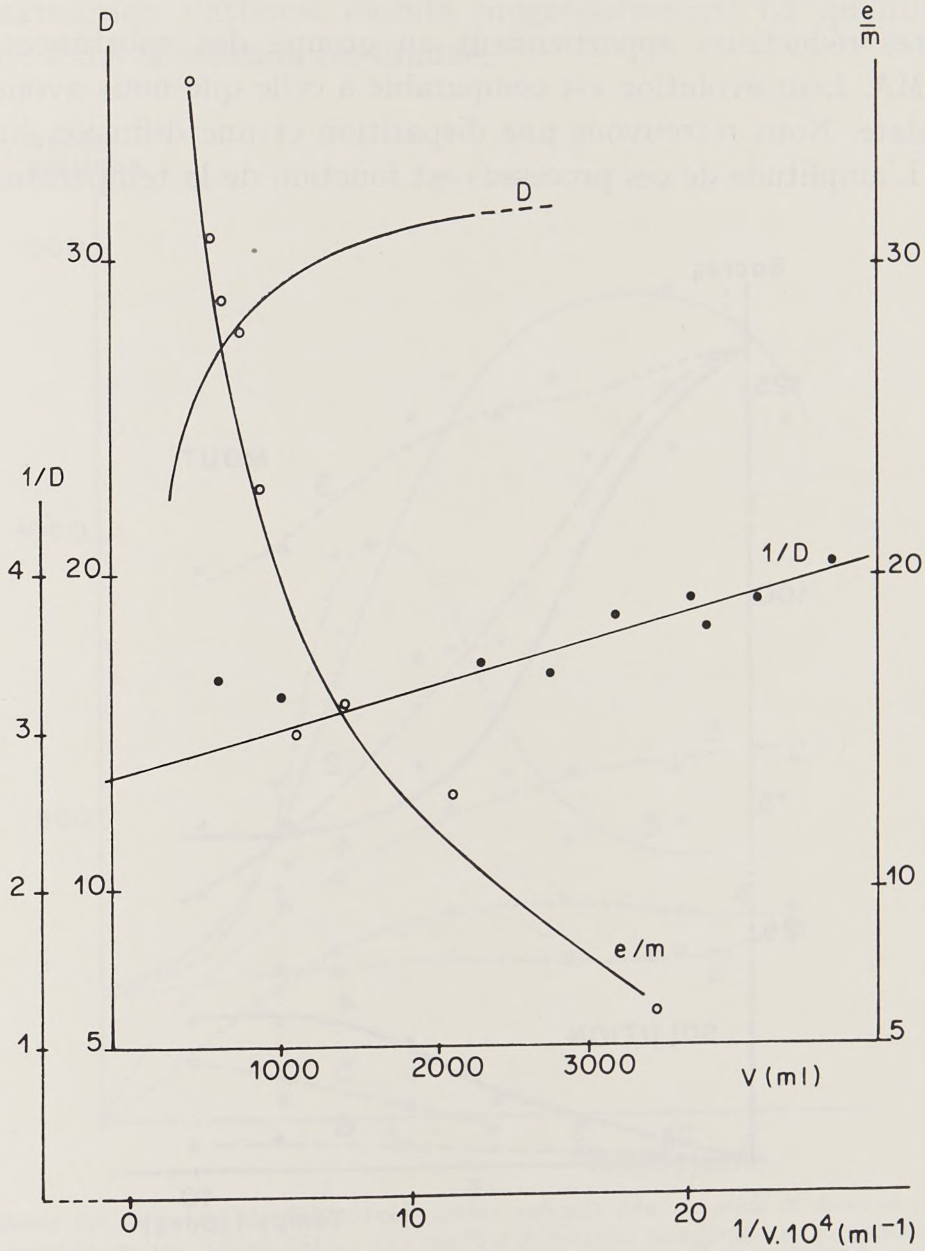


FIG. 7. — *Évolution du pourcentage de diffusion* (D) *et du rapport des concentrations dans la solution et le moût des quantités non dégradées en fonction du volume de la solution* (V) *pour un poids de baies constant.* Conditions expérimentales : 15 jours d'anaérobiose en milieu liquide (SO_2 = 150 mg/l, glucose 200g/l) à 35°C.

$$D = \frac{\text{quantité d'une substance dans la solution}}{\text{quantité totale de la substance (moût + solution)}}$$

Le rapport des concentrations de malate dans la solution et le moût $\frac{e}{m}$ n'est pas indépendant du volume de la solution et diminue systématiquement quand celui-ci est accru.

Nous retrouvons entre D et V une relation qui semble hyperbolique. En coordonnées inverses, la relation n'est plus linéaire pour des volumes de solution supé-

rieurs à six fois celui des baies. Par ailleurs, l'extrapolation de la portion de droite obtenue conduit à un volume de compartiment incompatible avec celui des baies mis en œuvre.

3. 1.4. *Catabolisme des sucres réducteurs, en fonction de la température, par des baies de raisin soumises à une anaérobiose en milieu liquide en présence de* SO_2 (150 mg/l) (fig. 8).

Les sucres réducteurs appartiennent au groupe des substances catabolisées au cours du MA. Leur évolution est comparable à celle que nous avons décrite dans le cas du malate. Nous retrouvons une disparition et une diffusion limitées de ces métabolites. L'amplitude de ces processus est fonction de la température.

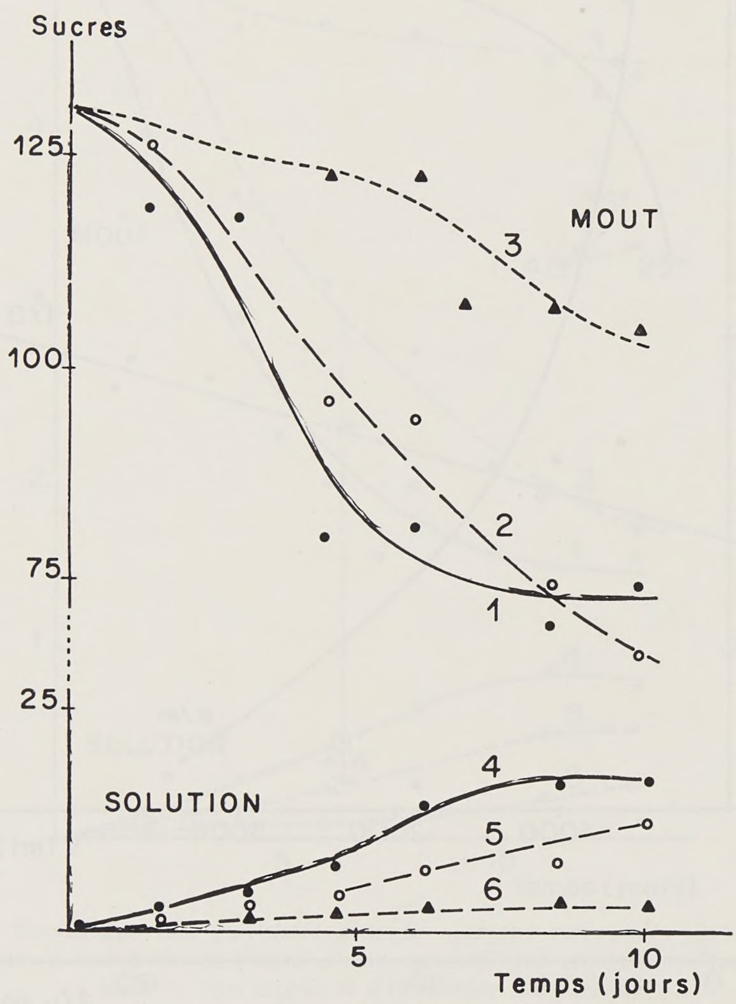


FIG. 8. — *Évolution de la quantité de sucres réducteurs dans le moût et dans la solution au cours d'une anaérobiose en milieu liquide* (SO_2 : 150 mg/l) *à différentes températures*

35°C moût : courbe 1	35°C solution : courbe 4
25°C moût : courbe 2	25°C solution : courbe 5
15°C moût : courbe 3	15°C solution : courbe 6

Expression des résultats : les résultats sont exprimés en grammes de sucres réducteurs pour 1 000 g de baies au début de l'expérience

Remarquons cependant que les quantités mises en jeu au cours du MA ne représentent que 10 à 20 p. 100 de la teneur totale en sucres réducteurs de la baie. Les fluctuations dues à la méthode de dosage et surtout à l'échantillonnage sont, dans ces conditions, trop importantes pour faire une étude quantitative précise de l'évolution de ces substances lors du MA en milieu liquide.

3. 1.5. *Extraction des polyphénols totaux, en fonction de la température, au cours d'une anaérobiose en milieu liquide en présence de* SO_2 (150 mg/l) (fig. 9).

A 35°C, dans le moût, après une phase de latence (un à trois jours), la quantité de polyphénols s'accroît rapidement. Un maximum est atteint vers le dixième jour puis la teneur décroît plus ou moins rapidement.

Dans la solution, nous observons un enrichissement rapide dès le premier jour. La vitesse d'extraction s'atténue ensuite progressivement. La quantité de polyphénols extraite dans la solution est limitée.

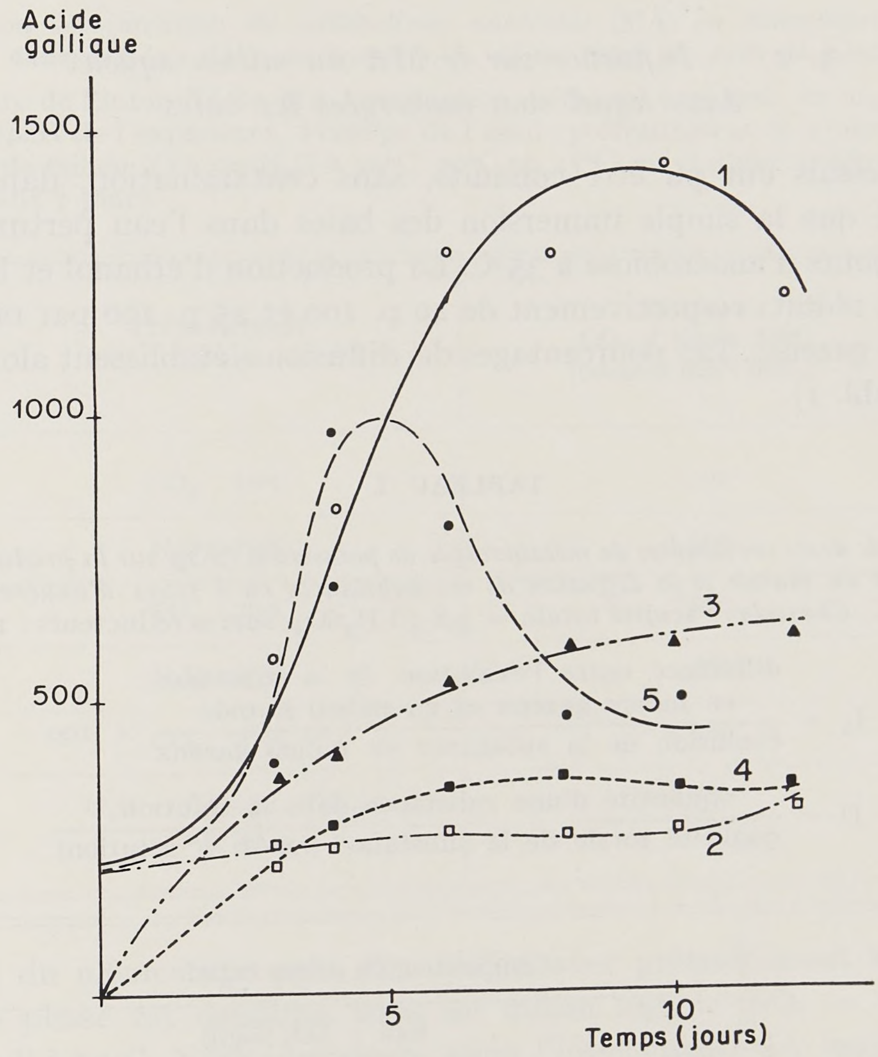


FIG. 9. — *Évolutions des quantités de polyphénols totaux extraits dans le moût et dans la solution au cours d'une anaérobiose en milieu liquide* (SO_2 : 150 mg/l) *à différentes températures*. Comparaison avec l'évolution de la quantité de polyphénols totaux extraits dans le moût au cours d'une anaérobiose gazeuse (CO_2).

Milieu liquide : moût { 35°C courbe 1 ; 25°C courbe 2 } solution { 35°C courbe 3 ; 25°C courbe 4 }

Milieu gazeux : moût 35°C courbe 5

Les polyphénols totaux sont exprimés en milligrammes d'acide gallique pour 1 000 g de baies au départ de l'expérience. Les courbes obtenues à 15°C étant très proches de celles enregistrées à 25°C n'ont pas été représentées sur la figure.

Dans l'essai considéré, lorsque la quantité de polyphénols dans le moût atteint son maximum, le coefficient d'accroissement de l'extraction (C*ae*) totale est égal à 9,4.

A 25°C et 15°C, les processus d'extraction dans le moût sont différents de ceux observés à 35°C. En effet, au cours de cet essai, l'extraction dans le moût des baies

est quasiment nulle. Dans d'autres cas, il peut se produire une chute de la teneur initiale du moût en polyphénols, d'une durée et d'une intensité variables.

Dans la solution, à 15 °C et 25 °C, la diffusion est semblable à celle observée à 35 °C. Cependant, sa vitesse et les quantités de polyphénols extraites sont nettement inférieures.

Dans le moût des baies soumises à une anaérobiose carbonique à 35 °C, les processus d'extraction sont semblables à ceux obtenus en anaérobiose liquide, bien que moins importants. La phase de latence peut être plus longue et le maximum atteint plus rapidement.

3. 2. — *Influence sur le MA du milieu aqueux dans lequel sont immergées les baies*

Quelques essais ont pu être conduits, sans contamination, dans l'eau seule. Ils ont montré que la simple immersion des baies dans l'eau perturbe fortement le MA après 8 jours d'anaérobiose à 35 °C. La production d'éthanol et le catabolisme du malate sont réduits respectivement de 40 p. 100 et 25 p. 100 par rapport au MA en anaérobiose gazeuse. Les pourcentages de diffusion s'établissent alors à 45 p. 100 et 33 p. 100 (tabl. 1).

TABLEAU 1

Action de l'eau et de doses croissantes de métabisulfite de potassium (SO_2) *sur la production d'éthanol, le catabolisme du malate et la diffusion de ces substances en 8 jours d'anaérobiose en milieu liquide à 35 °C. Chasselas :* acidité totale = 3,8 g/l H_2SO_4, sucres réducteurs : 187 g/l.

$$I_1 = \frac{\text{différence entre l'évolution de la substance en milieu gazeux et en milieu liquide}}{\text{évolution de la substance en milieu gazeux}} \times 100$$

$$D = \frac{\text{quantité d'une substance dans la solution}}{\text{quantité totale de la substance (moût + solution)}}$$

	Composition du milieu liquide							
	Eau	Eau + SO_2 (mg/l)						
		25	50	100	150	200	250	300
I_1 Éthanol	40	39	38,5	40	45	48	47	50
D Éthanol	45	46	45	45	45	46	45	45
I_1 Malate	25	24	22	26	26	29	27	40
D Malate	33	32	34	34	33	35	36	34

L'antiseptique ajouté (SO_2) aux doses utilisées (25 à 300 mg/l) augmente légèrement l'inhibition de la production d'éthanol et du catabolisme du malate. Il reste sans action sur le pourcentage de diffusion de ces substances. Son utilisation dans

l'ensemble de nos essais reste justifiée, car elle lève en partie la contrainte des contaminations microbiennes des solutions.

Après un prétraitement de 48 heures à 10°C et 30°C dans le CO_2 ou dans l'eau seule, les productions d'éthanol par les baies placées en atmosphère carbonique à 15°C peuvent être comparées (tabl. 2). Les deux lots placés à 10°C présentent des teneurs voisines en éthanol. En revanche, la production d'éthanol est fortement inhibée par un séjour de 48 heures dans l'eau à 30°C par rapport au lot CO_2.

TABLEAU 2

Comparaison des intensités du métabolisme anaérobie (MA) *en atmosphère carbonique dans des lots de baies ayant subi divers types de prétraitements*

Critère de mesure de l'intensité du MA : production d'éthanol exprimée en mg pour 1 000 g de baies au départ de l'expérience. Principe de l'essai : prétraitement de 2 jours dans différentes conditions de milieu (CO_2 ou H_2O à 10°C, 30°C ou 35°C) suivi d'une anaérobiose carbonique à 15°C durant 7 jours.

Prétraitement 2 jours	2e phase CO_2, 7 jours, 15°C (éthanol mg/1 000 g)
CO_2 10°C	1 500
H_2O 10°C	1 400
CO_2 30°C	2 600
H_2O 30°C	600
CO_2 35°C	4 000
H_2O + Glucose, 35°C, 200 g/l	3 700

Un essai du même type peut être réalisé avec prétraitement à 15°C et 35°C. La deuxième phase est conduite dans un milieu liquide (SO_2 = 200 mg/l ; glucose = 180 g/l) à 15°C. Nous comparons alors l'intensité du MA mais aussi celle des processus de diffusion (tabl. 3).

La production d'éthanol et le catabolisme du malate sont du même ordre de grandeur dans les lots préalablement immergés dans le CO_2 ou l'eau à 15°C. Cependant, les processus de diffusion seraient favorisés après un séjour dans l'eau. Ce phénomène est particulièrement sensible au niveau du malate qui reste dans les baies. Au septième jour, le pourcentage de diffusion est de 1,2 p. 100 pour le lot prétraité par le CO_2 alors qu'il atteint 6,1 p. 100 après un séjour dans l'eau.

Le maintien préalable dans l'eau à 35°C conduit, d'une part à un ralentissement sensible de la synthèse d'éthanol et du catabolisme du malate et, d'autre part, à une accélération de la diffusion de ces deux métabolites par rapport à l'intensité de ces processus mesurés dans un lot prétraité dans le CO_2 à 35°C.

Enfin, la température du prétraitement par le CO_2 joue sur l'intensité de la production d'éthanol au cours de la deuxième phase, bien que cette dernière soit

conduite à une température standard (15 °C). Les quantités d'éthanol retrouvées dans les lots ayant subi un prétraitement à 30 °C ou 35 °C sont supérieures à celles mesurées dans les échantillons placés à 10 °C ou à 15 °C lors de la première phase (tabl. 2, 3).

TABLEAU 3

Comparaison des intensités du métabolisme anaérobie (MA) *en milieu liquide pour des lots de baies ayant subi divers types de prétraitements*

Critères de mesure de l'intensité du MA : production d'éthanol (mg pour 1 000 g de baies au départ de l'expérience), catabolisme du malate (milliéquivalent de malate catabolisés pour 1 000 g de baies au départ de l'expérience). Pourcentage de diffusion :

$$D = \frac{\text{quantité d'une substance dans la solution}}{\text{quantité totale de la substance (moût + solution)}}$$

Principe de l'essai : prétraitement de 2 jours dans différentes conditions de milieu suivi d'une anaérobiose en milieu liquide (SO_2 : 200 mg/l, glucose : 180 g/l) à 15 °C durant 7 jours. CO_2 35 °C ou CO_2 15 °C = prétraitement en atmosphère de CO_2 à 35 °C ou 15 °C. H_2O 35 °C ou H_2O + glucose 35 °C ou H_2O 15 °C = prétraitement en milieu liquide à 35 °C ou 15 °C. 35 °C et 15 °C = prétraitement de 2 jours sous CO_2 suivi d'une anaérobiose carbonique à 15 °C durant 7 jours.

Prétraitement 2 jours	2e Phase : 7 jours, 15 °C			
	Diffusion		Catabolisme Malate	Production Éthanol
	D Malate	D Éthanol		
CO_2 35 °C	3,6	20	0,9	3 300
H_2O 35 °C	16,1	27	0	2 700
CO_2 15 °C	1,2	12	0,6	2 600
H_2O 15 °C	6,1	15	0,7	2 500
H_2O + Glucose 35 °C 250 g/l	6,9	22	0,6	3 100
CO_2 35 °C			2,5	3 500
CO_2 15 °C			1,6	2 500

3. 3. — *Influence de la composition de la solution sur le MA en milieu liquide*

La composition de la solution initiale de SO_2 peut être modifiée par certaines substances qui se rencontrent dans un moût en fermentation (polyphénols, acide tartrique, éthanol, glucose).

3. 3.1. *Action du glucose.*

Le glucose ajouté à une solution de SO_2 (200 mg/l) à des doses croissantes (50 à 200 g/l) limite progressivement l'inhibition de la production d'éthanol (46 à 20 p. 100) et du catabolisme du malate (30 à 9 p. 100), mesurée après 8 jours d'anaérobiose à 35 °C (tabl. 4).

Dans le cas du malate, l'effet du glucose s'exerce d'une part sur l'activité méta-

bolique des baies (I_2 passe de 14 à 0 p. 100) et d'autre part sur l'intensité de la diffusion (I_3 passe de 16 à 9 p. 100) augmentant ainsi le catabolisme du malate.

L'addition de glucose limite la diffusion de l'éthanol produit (50 à 44 p. 100) et du malate non dégradé (31 à 20 p. 100).

Après un prétraitement de 48 heures à 35°C dans le CO_2 ou dans une solution de glucose (200 g/l), la production d'éthanol au cours d'une deuxième phase en anaérobiose carbonique (tabl. 2) ou liquide (tabl. 3) est peu ralentie pour le lot prétraité dans un milieu enrichi en glucose. En revanche, la diffusion de l'éthanol produit et du malate non dégradé est sensiblement accrue.

TABLEAU 4

Action de doses croissantes de glucose ajoutées à la solution (SO_2 200 mg/l) *sur la production d'éthanol, le catabolisme de l'acide malique et la diffusion de ces substances en 8 jours d'anaérobiose en milieu liquide à 35°C.*

Rappel de définitions (BURET, CHAMBROY, FLANZY, 1975)

I_1 mesure l'inhibition globale créée par le milieu liquide par rapport à un témoin gazeux
I_2 mesure l'action de la solution sur l'activité métabolique des baies
I_3 mesure l'influence de la diffusion de la substance sur l'inhibition totale I_1 pour des baies soumises à une inhibition I_2.
D rapport de la quantité d'une substance dans la solution à la quantité totale (moût + solution) de la substance

	Glucose (g/l)			
	0	50	100	200
I_1 Éthanol	46	30	22	20
D Éthanol	50	51	48	44
I_1 Malate	30	26	23	9
I_2 Malate	14	14	9	0
I_3 Malate	16	12	14	9
D Malate	31	24	26	20

3. 3.2. *Action d'autres substances.*

Production et diffusion de l'éthanol en 8 jours d'anaérobiose à 35°C (tabl. 5).

Parmi les différentes substances testées, seuls l'acide tartrique et l'éthanol diminuent nettement cette synthèse. L'acide tartrique (10 g/l) conduit à une inhibition égale à 87 p. 100. L'action de l'éthanol est sensible à partir de 4°GL. La production est nulle pour une solution à 8°GL.

La diffusion de l'éthanol produit n'est pas affectée par l'addition de polyphénols. En présence de solution d'éthanol, les baies peuvent s'enrichir en cette substance. Pour toutes les doses utilisées, en 8 jours, le pourcentage de diffusion s'établit entre 56 et 58 p. 100. Le rapport des concentrations $\left(\frac{e}{m}\right)$ est alors voisin de 1,3.

TABLEAU 5

Action des substances ajoutées à la solution sur la production et la diffusion de l'éthanol, à 35°C, en 8 jours d'anaérobiose en milieu liquide

$$I_1 = \frac{\text{différence entre les productions d'éthanol en milieu gazeux et milieu liquide}}{\text{production d'éthanol en milieu gazeux}} \times 100$$

La production d'éthanol en milieu gazeux est mesurée à partir d'un lot de baies placé en anaérobiose carbonique à 35°C pendant 8 jours

$$D = \frac{\text{quantité d'éthanol dans la solution}}{\text{quantité totale (moût + solution) d'éthanol}}$$

G = acide gallique (mg/l)
T = acide tartrique (g/l)
E = éthanol (°GL)
S = glucose (g/l)

		Substances ajoutées à la solution (SO_2 = 200 mg/l)								G 500 E 6 S 100
		G		T	E					
		500	1 000	10	2	4	6	8	10	
I_1	38	38	42	87	38	68	88	100	100	88
D	51	53	53		57	57	57	56	58	56

TABLEAU 6

Action des substances ajoutées à la solution sur l'intensité du catabolisme de l'acide malique et sur la diffusion de cet acide à 35°C, en 8 jours d'anaérobiose en milieu liquide

$$I_1 = \frac{\text{différence entre malate catabolisé en milieu gazeux et milieu liquide}}{\text{malate catabolisé en milieu gazeux}} \times 100$$

Le malate catabolisé en milieu gazeux est mesuré à partir d'un lot de baies placé en anaérobiose carbonique à 35°C pendant 8 jours

I_2 mesure l'action de la solution sur l'activité métabolique des baies
I_3 mesure l'influence de la diffusion du malate sur l'inhibition totale I_1 pour les baies soumises à une inhibition I_2.

$$D = \frac{\text{quantité malate mesurée dans la solution}}{\text{quantité totale (moût + solution) de malate}}$$

G = acide gallique (mg/l)
T = acide tartrique (g/l)
E = éthanol (°GL)
S = glucose (g/l)

		Substances ajoutées à la solution (SO_2 = 200 mg/l)								G 500 E 6 S 100
		G		T	E					
		500	1 000	10	2	4	6	8	10	
I_1	46	55	45	90	45	60	64	70	86	60
I_2	19	25	19	66	19	36	41	46	62	38
I_3	27	30	26	24	26	24	23	24	24	22
D	37	35	31	34	31	31	31	31	34	27

Catabolisme et diffusion du malate en 8 jours d'anaérobiose à 35°C (tabl. 6)

L'acide tartrique (10 g/l) entraîne une inhibition globale I_1 voisine de 90 p. 100. De même, l'éthanol (2°GL à 10°GL) conduit à des valeurs de I_1 allant de 45 à 86 p. 100. Par référence à la solution initiale de SO_2, l'action de l'acide tartrique et de l'éthanol se situe au niveau des voies métaboliques (I_2 passe de 19 à 66 et 62 p. 100) et l'influence de la diffusion du malate sur l'inhibition totale est peu modifiée (I_3 = 27 et 34 p. 100).

L'addition de telles substances pourrait retarder légèrement la diffusion du malate.

Un mélange (SO_2 = 200 mg/l, polyphénols = 500 mg/l, éthanol = 6°GL, glucose = 100 g/l) provoque une atténuation de l'intensité du MA voisine de celle observée dans la solution équivalente de SO_2 et éthanol.

Extraction des polyphénols (tabl. 7).

Après huit jours de MA dans une solution de SO_2 (200 mg/l), le coefficient d'accroissement de l'extraction totale (C_{CO_2}) s'établit à une valeur égale à 2,7.

L'acide tartrique (10 g/l) modifie peu l'extraction totale (2,8). L'éthanol ajouté à la solution de SO_2 (200 mg/l) à des doses finales comprises entre 2°GL et 10°GL peut augmenter progressivement l'extraction totale (accroissement de 2,6 à 3,1). De même, l'addition de glucose (200 g/l) conduit à un coefficient de l'ordre de 2,9.

En revanche, la présence d'acide gallique (500 et 1 000 mg/l) dans la solution réduit nettement l'extraction (accroissement de 1,9 et 1,7).

TABLEAU 7

Action des substances ajoutées à la solution sur l'extraction et la diffusion des polyphénols, à 35°C, en 8 jours d'anaérobiose en milieu liquide

$$C_{CO_2} = \frac{\text{quantité de polyphénols extraits au cours du MA en milieu liquide}}{\text{quantité de polyphénols extraits au cours du MA en milieu } CO_2}$$

$$D = \frac{\text{quantité de polyphénols extraits dans la solution}}{\text{quantité totale (moût + solution) de polyphénols extraits}}$$

G = acide gallique (mg/l)
T = acide tartrique (g/l)
E = éthanol (°GL)

Pour les deux lots plongés dans une solution d'acide gallique, les taux d'extraction correspondent aux polyphénols réellement extraits, déduction faite de l'acide gallique ajouté. Au cours d'un autre essai conduit dans des conditions sensiblement identiques, l'addition de glucose (200 g/l) à la solution (SO_2 = 200 mg/l) modifie peu les valeurs de C_{CO_2} (2,9) et de D (39).

		Substances ajoutées à la solution (SO_2 = 200 mg/l)							
		G		T	E				
		500	1 000	10	2	4	6	8	10
C_{CO_2}	2,7	1,9	1,7	2,8	2,6	2,9	3	3,1	2,9
D	41	25	13	50	41	41	39	42	39

En présence de SO_2, d'éthanol et de glucose, pour des extractions totales relativement voisines, les quantités de polyphénols qui diffusent dans la solution par rapport à la quantité totale de polyphénols présents sont comparables (39 à 42 p. 100). L'acide tartrique modifie la diffusion vers la solution (50 p. 100) sans influencer nettement l'extraction totale.

En présence d'acide gallique, la proportion de polyphénols qui a diffusé de la baie dans la solution est fortement diminuée (25 p. 100 et 13 p. 100).

L'importance des relations qui peuvent exister entre des métabolites du moût

TABLEAU 8

Influence d'une addition de malate ou d'éthanol au cours d'un prétraitement en milieu liquide (eau) *sur le métabolisme anaérobie* (MA) *de raisins placés ensuite en anaérobiose carbonique*

M = acide malique ; E = éthanol. Critères de mesures de l'intensité du MA : production d'éthanol et malate dégradé exprimés respectivement en mg et meq pour 1 000 g de baies au départ de l'expérience.

Principe de l'essai :

1re phase : prétraitement de 2 jours à 35°C dans l'eau additionnée de malate ou d'éthanol. Nous considérons que les quantités de malate ou d'éthanol qui ont disparu des solutions ont pénétré dans les baies.

2e phase : anaérobiose de 10 jours dans le CO_2 à 20°C
— la production d'éthanol est mesurée par différence entre l'éthanol du moût des baies à la fin de l'essai et l'éthanol absorbé lors de la première phase.
— la quantité de malate dégradée est déterminée par différence entre la teneur en malate du moût des lots au début et à la fin de l'essai, augmentée de la quantité absorbée par les baies pendant la première phase.

Un lot de baies a été placé en atmosphère de CO_2 durant 2 jours à 35°C, puis 10 jours à 20°C.

1re phase		2e phase	
Substance ajoutée M (meq/l) ; E (°GL)	Quantité de substance absorbée en 2 jours M (meq/1 000 g) ; E (mg/1 000 g)	M catabolisé (meq/1 000 g)	E synthétisé (mg/1 000 g)
M 20	M — 0,3	20,2	8 400
M 50	M 3,4	25,9	9 200
M 70	M 5,7	24,3	6 300
M 100	M 11	28,1	7 300
E 6	E 7 200	20,5	7 500
E 10	E 17 600	20,4	230
E 14	E 25 700	23	0
E 18	E 34 500	22,2	0
CO_2		21,8	13 200

(malate et éthanol) et le milieu liquide dans lequel sont plongées les baies nous conduit à essayer de préciser l'action de l'éthanol et du malate qui peuvent être ajoutés à la solution.

Au cours d'un prétraitement des lots dans des solutions de malate ou d'éthanol, les baies s'enrichissent en ces métabolites. La production d'éthanol et le catabolisme du malate sont ensuite mesurés après 10 jours d'anaérobiose carbonique à 20°C (tabl. 8).

1. *Addition de malate.*

Les quantités de malate, absorbées (ou excrétées) par les baies varient de —0,3 meq à +11 meq. pour 1 000 g de raisin. Nous ne pouvons pas observer, dans cet essai, une influence significative d'une telle addition sur la production ultérieure d'éthanol. En revanche, la quantité de malate dégradé par les baies augmente sensiblement. Elle peut être supérieure à celle observée dans un témoin placé en anaérobiose carbonique.

2. *Addition d'éthanol.*

Les quantités d'éthanol absorbées par les baies passent de 7 200 mg à 34 500 mg pour 1 000 g de raisin. Nous ne notons pas ici de réduction du catabolisme du malate En revanche, la synthèse de l'éthanol est rapidement bloquée. Cette inhibition apparaît quand les baies atteignent, par synthèse et par diffusion à partir de la solution, une teneur sensiblement égale à celle qui est produite lors du MA en milieu gazeux.

4. — DISCUSSION

4. 1. — *Production d'éthanol et dégradation du malate au cours du MA en milieu liquide*

Existence du MA en milieu liquide et phénomènes de diffusion qui l'accompagnent.

Une production d'éthanol et une dégradation du malate sont observées aux 3 températures expérimentales. L'analogie entre les courbes obtenues lorsque l'anaérobiose est créée par un milieu liquide et celles établies au cours du MA en milieu gazeux permet d'attribuer ces phénomènes aux mêmes processus métaboliques (André et Flanzy, 1967). Par rapport à l'anaérobiose gazeuse, ceux-ci sont partiellement inhibés dans ces nouvelles conditions. Le MA en milieu liquide s'accompagne de la diffusion de diverses substances à travers la pellicule des baies.

Causes de la diminution d'intensité du MA en milieu liquide.

Les observations suivantes peuvent permettre de proposer une interprétation.

Dans quelques cas, nous avons observé dans l'eau une inhibition des deux processus métaboliques équivalente à celle observée en présence de faibles doses de SO_2 (1) (50 à 100 mg/l) après 8 jours d'anaérobiose. La présence de glucose (200 g/l environ) limite nettement d'une part les inhibitions observées lorsque les baies

(1) Le SO_2 est ajouté à l'eau sous forme de métabisulfite de potassium.

sont plongées dans l'eau ou une solution de SO_2 et, d'autre part, la diffusion de l'éthanol produit ou du malate qui reste dans les baies.

L'action du glucose sur la production de l'éthanol, le catabolisme du malate et la diffusion de ces deux substances, conduit à attribuer à la faible pression osmotique des solutions initialement utilisées une part importante des inhibitions mesurées.

Un prétraitement dans différentes conditions d'anaérobiose permet de vérifier cette hypothèse. En effet, l'atténuation du MA et l'accroissement des diffusions au cours de la deuxième phase sont d'autant plus élevés que le milieu liquide utilisé dans le prétraitement présente une faible pression osmotique. En outre, les manipulations de ce type précisent nettement l'influence du milieu liquide, par rapport à celle du milieu gazeux utilisé dans le prétraitement, sur les phénomènes métaboliques et diffusifs de la deuxième étape.

Au cours d'une première phase conduite en anaérobiose carbonique ou liquide, la quantité de malate dégradée est d'autant plus grande que la température des baies est élevée.

Or, dans tous les lots prétraités à 35 °C, malgré une concentration résiduelle de malate inférieure à celle des échantillons prétraités à 15 °C, la diffusion de ce métabolite au cours de la deuxième phase de l'expérience est plus importante.

Ces observations ne peuvent être réalisées en ce qui concerne l'éthanol. En effet, sa production augmente avec la température du prétraitement. Une diffusion accrue de l'éthanol dans la deuxième phase suivant un séjour à 35 °C semble logique. Ainsi, contrairement au malate, l'éthanol n'apparaît pas être un révélateur efficace de cette influence originale de la température sur la diffusion. Enfin, la réduction d'intensité du MA se produit brutalement après quelques jours d'anaérobiose.

En conclusion, ces différents faits pourraient être interprétés comme la manifestation d'une désorganisation cellulaire progressive et irréversible conduisant au blocage du MA. Des pressions osmotiques faibles en solution et des températures élevées dans tous les milieux augmenteraient la vitesse de ce processus caractéristique du MA.

Parallèlement à l'influence du milieu aqueux associé à la température, certaines substances ajoutées (acide tartrique, éthanol, SO_2 à des concentrations élevées) sont susceptibles d'accroître l'inhibition du MA tout en ne modifiant pas l'intensité de la diffusion.

Ce découplage des réactions métaboliques et des échanges diffusifs incite à penser que l'action des substances ajoutées relève d'autres mécanismes.

Hypothèses relatives à l'influence de hautes températures en début d'anaérobiose sur le MA des baies.

Le temps nécessaire (3 heures) pour ramener la température des baies, prétraitées à 30 °C ou 35 °C, à 15 °C lors de la deuxième phase est trop bref pour expliquer la production supérieure d'éthanol dans ces lots par rapport à ceux conditionnés à une température plus basse dans la première phase.

Il est possible que les hautes températures en anaérobiose permettent l'activation rapide de l'activité de certaines enzymes par modification des concentrations de différents métabolites de la baie.

Une synthèse accrue de ces enzymes dans les premiers temps de l'anaérobiose peut également être envisagée. Des études au laboratoire ont montré, par exemple,

un accroissement rapide de l'activité spécifique de l'enzyme malique (E.C. 1.1.1.40) entre 2 et 3 jours d'anaérobiose à 35°C (GARCIA, 1975).

Répartition de l'éthanol et du malate dans la baie.

Cas de l'éthanol.

La valeur du rapport $\frac{e}{m}$ s'écarte systématiquement de 1 quand le volume de la solution s'accroît. D'autre part, lorsque différents lots sont plongés dans des solutions enrichies en éthanol, $\frac{e}{m}$ prend en 8 jours une valeur égale à 1,3. Ces deux types de résultats conduisent à rejeter l'existence d'un seul compartiment éthanol dans la baie de raisin. L'hypothèse simple de deux compartiments relativement indépendants pourrait être admise.

Cette dernière hypothèse est fragile, car elle repose sur le postulat d'une indépendance entre la production d'éthanol et le volume de la solution.

Effectivement, dans nos conditions expérimentales, une augmentation de la production d'éthanol n'apparaît pas pour des volumes croissants de solution.

Par contre, l'addition d'éthanol à la solution réduit, par diffusion dans la baie, sa synthèse. Ce dernier résultat introduit l'idée d'une concentration limite d'éthanol dans la baie au cours du MA. Dans une telle perspective, lorsque la solution absorbe partiellement l'alcool produit par la baie, sa synthèse pourrait être accrue afin d'atteindre cette concentration limite. Nos conditions expérimentales ne permettraient pas la mise en évidence de cet accroissement.

Mais, d'autre part, l'augmentation du volume de la solution entraîne une diffusion plus importante d'un ensemble de métabolites de la baie. Cette déperdition conduirait à une désorganisation cellulaire plus rapide et donc empêcherait la synthèse d'éthanol de continuer à un rythme normal.

Ainsi, les lots soumis à une anaérobiose en milieu liquide (SO_2, glucose) dans des volumes croissants de solution ne seraient plus directement comparables.

Cas du malate.

L'étude de l'évolution du rapport $\frac{e}{m}$ nous conduit à rejeter l'hypothèse d'un compartiment malate unique dans la baie de raisin. L'hypothèse relative à l'existence de deux compartiments indépendants conduit à une impossibilité quant à la taille de ceux-ci.

Obtenu par diffusion relativement rapide, l'enrichissement des baies en malate a permis de montrer un accroissement de la quantité de malate dégradée. Inversement, si dans nos conditions expérimentales nous n'avons pas pu observer une diminution nette de ce catabolisme, pour des volumes croissants de solution, il est cependant probable que ce processus existe.

Nous ne pouvons donc interpréter de manière simple l'existence d'un équilibre au niveau de la diffusion de ce métabolite. VENTRE (1930) signale une répartition des sucres réducteurs et des acides organiques de la baie en trois zones concentriques de richesses inégales à l'intérieur de la baie. Un modèle de répartition voisin de ce type pourrait être envisagé dans le cas de l'acide malique. Par ailleurs, ces observations peuvent rejoindre l'hypothèse de l'existence de compartiments métaboliques différents formulée par FLANZY (FLANZY C. *et al.*, 1969, 1971) dans la baie de raisin.

4. 2. — *Évolution des polyphénols totaux au cours du MA en milieu liquide*

Il existe une grande similitude dans les processus d'extraction des polyphénols au cours d'une anaérobiose créée par le gaz carbonique ou par un milieu liquide. Comme en milieu gazeux, la température est un facteur essentiel de l'intensité de l'extraction des substances phénoliques.

L'anaérobiose en phase liquide à 35 °C provoque un accroissement important de l'extraction des polyphénols de la pellicule vers le moût des baies, par rapport à celle qui se produit à cette température en anaérobiose carbonique.

Il semble que, contrairement aux phénomènes observés pour l'éthanol et le malate, les échanges entre le moût et la solution soient limités pour les substances polyphénoliques. En effet, les vitesses de diffusion des polyphénols dans ces deux milieux à partir de la pellicule varient de façon indépendante. L'enrichissement de la solution est rapide pendant la phase de latence de l'extraction dans le moût. Il se ralentit ensuite au moment où l'accroissement dans le moût s'accélère et ou la différence de concentration moût-solution favorise le passage des polyphénols du moût vers celle-ci.

Si la solution est enrichie en acide gallique, l'extraction des polyphénols est réduite. Cependant, la teneur en polyphénols du moût reste comparable à celle obtenue en présence de SO_2 seul. La présence d'acide gallique dans la solution modifierait peu la diffusion dans le moût et limiterait seulement l'extraction des polyphénols qui appartiennent aux couches superficielles de la pellicule.

5. — CONCLUSIONS

Le métabolisme anaérobie (MA) des baies de raisin entières est observé lorsque l'anaérobiose est créée par un milieu liquide. Les processus biochimiques caractéristiques du MA sont analogues à ceux observés lorsqu'elle est créée par un gaz. La température et la durée de l'anaérobiose restent, dans un milieu liquide, les facteurs principaux qui contrôlent ce métabolisme.

L'emploi d'une anaérobiose en milieu liquide, différente de celle crée par les gaz (CO_2, N_2, Argon) usuellement utilisés au laboratoire, permet de préciser certains points.

Au niveau du MA des baies en milieu liquide

Des baies plongées dans un milieu anaérobie liquide présentent une intensité du MA réduite par rapport à celle observée lorsque l'anaérobiose est créée par le CO_2. Une part importante de cette inhibition doit être attribuée au milieu liquide lui-même qui accélèrerait les processus de désorganisation cellulaire pouvant accompagner le MA. Des substances dissoutes dans la solution exercent aussi une action non négligeable. Celle-ci semble être sensible au niveau du catabolisme du malate. Or le métabolisme de cet acide est très actif au cours du MA des baies de raisin (FLANZY *et al.*, 1968, 1971).

D'autres facteurs (maturité, variété), qui n'ont pas été systématiquement étudiés (travail en cours), doivent avoir une influence importante sur l'intensité des processus décrits.

Des échanges de substances ont lieu entre le moût des baies et la solution. L'importance, la direction de ces échanges et les substances concernées, dépendent de la température, de la durée du MA et de la composition respective des deux milieux.

Au niveau du métabolisme anaérobie des baies de raisin

Un certain nombre d'observations ont permis d'interpréter la réduction d'intensité du MA en milieu liquide comme la manifestation d'une désorganisation cellulaire progressive et irréversible conduisant au blocage du MA. Ce processus serait généra et permettrait d'expliquer l'arrêt plus rapide du MA à 35°C qu'à 25°C en anaérobiose carbonique.

Des études d'enzymologie relatives aux enzymes du MA et à celles du catabolisme cellulaire, associées à des études cytologiques, devraient permettre une meilleure compréhension de ce mécanisme.

Une répartition hétérogène de l'éthanol et du malate dans la baie a été mise en évidence. Les conditions expérimentales imparfaites qui ont été utilisées ne permettent pas une interprétation plus précise de l'établissement d'un équilibre de diffusion pour ces substances.

Enfin des résultats fragmentaires qui doivent être confirmés peuvent être l'indice d'une activation rapide de l'activité ou d'une synthèse de certaines enzymes du MA lorsque la température d'anaérobiose est élevée (35°C).

Intérêt appliqué de l'étude du MA en milieu liquide

Cette étude a été entreprise dans le but d'orienter les essais et la conduite de la vinification par MC.

Les techniques expérimentales adoptées pour l'étude du MA en milieu liquide pourraient apporter des critères supplémentaires (résistance mécanique des baies) dans l'appréciation de l'aptitude des cépages à la vinification par MC.

L'extraction des polyphénols est accrue lors du MA en milieu liquide, tandis que l'intensité de ce métabolisme est réduite. La diffusion des substances de la baie peut modifier les caractéristiques fermentaires des jus de goutte lors de la première phase de la vinification, en particulier au niveau des substances de croissances dont l'existence a été mise en évidence par BARRE (1971).

Dans ces conditions, une séparation permanente des jus de goutte et des baies au cours de la première phase de la vinification peut être souhaitable afin de favoriser le MA. Lors de la vinification en blanc ou en rosé, une extraction trop importante de polyphénols qui nuirait à la couleur de ce type de vin pourrait être évitée. Dans le cas d'une vinification en rouge, des remontages du jus de goutte qui favorisent l'éclatement et la macération des baies (ANDRÉ et FLANZY, 1967) pourraient être pratiqués seulement en fin de cuvaison, afin d'accroître l'extraction des matières colorantes des baies, sans diminuer sensiblement la part du MA. Une étude plus détaillée (en cours) de l'évolution des différentes classes de polyphénols (matières colorantes, tanins) pourrait permettre une meilleure conduite de la vinification (BOURZEIX, 1973).

Enfin, les techniques qui consistent à fouler une partie de la vendange dans la cuve de MC ou bien à ajouter diverses substances (acide tartrique, SO_2) dans le moût du fond de cuve limitent le MA des baies entières et doivent être pratiquées avec prudence.

Il faut cependant remarquer que ces études de laboratoire sont loin d'être comparables à l'ensemble des phénomènes qui se déroulent dans une cuve de vinification. En effet :

— le jus de goutte fermente progressivement et le MA des baies entières peut, dans les premiers jours, êtres moins affecté qu'il n'a été montré dans nos essais.

— L'effet de tassement de la vendange peut être accentué si le jus de goutte est régulièrement éliminé. Le nombre de baies qui éclatent peut ainsi être augmenté.

Une action des levures sur la baie qui accélèrerait sa désorganisation n'est pas exclue.

Reçu pour publication en septembre 1975.

REMERCIEMENTS

De nombreuses déterminations d'acide malique ont pu être réalisées avec l'appareil de dosage automatique de l'Institut Coopératif du Vin de Montpellier. Nous en remercions vivement les dirigeants de cet organisme.

SUMMARY

METABOLISM IN GRAPE BERRIES IMMERSED IN A LIQUID MEDIUM.
II. — EXPERIMENTAL STUDY.

The existence of an anaerobic metabolism (A.M.) in grape berries immersed in a liquid medium was demonstrated. The A.M. in a liquid medium was compared to the A.M. in a gaseous medium. Two experimental techniques have been used : one involving relatively long contact times between the grapes and the solution (8 days) ; the other divided in two stages allowing to measure the influence of a short (2 days) pretreatment on the A.M. intensity.

Ethanol production and malate catabolism (typical phenomena of the A.M. in a gaseous medium) are generally reduced in a liquid medium whereas total polyphenol extraction is increased In this medium exchanges of substances between the grapes and the solution are observed in addition to the A.M.

It is also assumed that a progressive and irreversible disorganization of grape cells takes place during A.M. whatever the medium producing the anaerobiosis may be. A compartmentation of ethanol and malate in the grape berry is revealed. An activation (or synthesis) of certain enzymes involved in this metabolism seems to be favoured by high temperatures.

Some directions (separation of berries and drip juice, pumping over) are given concerning the process of wine-making with maceration in presence of carbon dioxide.

RESUMEN

METABOLISMO DE LA BAYA DE UVA EN MEDIO LIQUIDO.
II. — ESTUDIO EXPERIMENTALE.

La existencia de un metabolismo anaerobio (M.A.) en las bayas de uva sumergidas en un medio líquido, queda puesta de manifiesto en este artículo. El M. C. en mediolíquido es comparado con el M.A. en medio gaseoso. Se utilizan para ellos dos técnicas experimentales : en una de ellas

se recurre a tiempos de contacto entre bayas y solución relativamente largos (8 días) ; en la otra, que consta de dos etapas, permite medir la influencia de un pretratamiento de corta duración (2 días) sobre la intensidad del M.A.

La producción de etanol y el catabolismo del malato (fenómenos caractéristicos del M.A. en medio gaseoso), son generalmente atenuados en el medio líquido, mientras que la extracción de los polifenoles totales sufre un incremento. En este medio, el M.A. se acompaña de procesos de intercambio de substancias entre las bayas y la solución.

Además, se sospecha la existencia de una desorganización progresiva e irreversible de las células de la baya durante el transcurso del M.A., sea cual fuere el medio generador de la anaerobiosis, e una compartimentación del etanol y del malato en la baya es perfectamente evidenciado. Finalmente, parece que una activación (o una síntesis) de ciertas enzimas implicadas en este metabolismo se vea favorecida por una temperatura elevada.

Algunas orientaciones (separación de bayas — zumos de gota — remontajes) son indicadas por lo que se refiere al nivel del control de una vinificación por maceración carbónica.

RIASSUNTO

METABOLISMO DELLA BACCA D'UVA IN MEZZO LIQUIDO. II. — STUDIO SPERIMENTALE.

Lo studio mette in evidenza l'esistenza di un metabolismo anaerobico (M.A.) nelle bacche d'uva immerse in un mezzo liquido. Il M.A. in mezzo liquido è confrontato al M.A. in mezzo gassoso. Vengono adottate due tecniche sperimentali : una impiega dei tempi di contatto tra bacche e soluzioni che sono relativamente lunghi (8 giorni) ; l'altra, che è costituita da due tappe, permette di misurare l'influenza di un pre-trattamento di breve durata (2 giorni) sull'intensità del M.A.

La produzione d'etanolo e il catabolismo del malato (fenomeni caratteristici del M.A. in mezzo gassoso) sono generalmente attenuati nel mezzo liquido mentre l'estrazione dei polifenoli totali ne è aumentata. In questo mezzo, accanto al M.A., abbiamo un processo di scambio di sostanze tra le bacche e la soluzione.

Si suppone inoltre che esista una disorganizzazione progressiva e irreversibile delle cellule della bacca durante il M.A. qualunque sia il mezzo generatore dell'anaerobiosi. Viene messa in evidenza una compartimentazione dell'etabolo e del malato nella bacca. Sembra infine che un'attivazione (o una sintesi) di alcuni enzimi implicati in questo metabolismo sia favorita da una temperatura elevata.

Come conclusione sono dati alcuni orientamenti (separazione bacche — succo di gocciolamento, risalite) sul metodo della vinificazione con macerazione carbonica.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

André P., Flanzy C., 1967. Vinification avec macération carbonique. *2e Symposium international d'Œnologie*, **2**, 531-548, I. N. R. A. Paris.

Barre P., 1971. Rendement en levures des jus de macération carbonique. *C. R. Journées Macération carbonique*, 10-11 février 1971, 120-121.

Benard P., Buret M., Flanzy C., Bourzeix M., 1971 *a*. Méthode de vinification par macération carbonique. V. Influence de la hauteur de vendange dans la cuve sur la qualité des vins. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 35-47.

Benard P., Bourzeix M., Buret M., Flanzy C., Mourgues J., 1971 *b*. Méthode de vinification par macération carbonique. VI. Élaboration des vins blancs secs. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 199-215.

Bourzeix M., 1973. Exposé sur la diffusion des composés phénoliques. Colloque franco-roumain sur la macération carbonique, Narbonne-Montfavet (France). Station d'Œnologie et de Technologie végétale, Narbonne.

Buret M., Chambroy Y., Flanzy C., 1975. Métabolisme anaérobie de la baie de raisin en milieu liquide. I. Aspects méthodologiques. *Ann. Technol. agric.* (sous presse).

Flanzy C., Flanzy M., André P., Chambroy Y., 1968. Fixation à l'obscurité du $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin, en anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 287-297.

FLANZY C., FLANZY M., ANDRÉ P., CHAMBROY Y., 1969. Fixation à l'obscurité du $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin en anaérobiose. II. Devenir du ^{14}C au cours de la fermentation intracellulaire. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 307-325.

FLANZY M., BENARD P., FLANZY C., SCHOBER A., 1969. Détermination du degré alcoolique de vins et de solutions hydroalcooliques à faibles concentrations en éthanol au moyen du mélange sulfo-chromique. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 367-374.

FLANZY C., BURET M., CHAMBROY Y., 1971. Fixation à l'obscurité de l'acide malique 3-^{14}C par des baies de raisin placées en anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 49-60.

GARCIA P., 1975. *Contribution à l'étude de l' « enzyme malique » du raisin l-malate : NADP oxydoréductase* (decarboxylating). E.C. 1.1.1.40. Thèse de Spécialité, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.

POUX C., 1969. Dosage enzymatique de l'acide L (—) malique. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 359-366.

PRO M. J., 1952. Tannin in wines and whiskies. *Association of official agricultural chemists*, **35**, 255-257.

VENTRE J., 1930. *Traité de vinifications pratique et rationnelle*, **1**, 18-25. Librairie Coulet, Montpellier

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (1), 73-84.

LES CAROTÉNOÏDES DE LA PRUNE D'ENTE (¹) ET DU PRUNEAU D'AGEN (¹)

M. MOUTOUNET

Laboratoire de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches de Toulouse, I. N. R. A.,
B.P. 12, 31320 Castanet-Tolosan

RÉSUMÉ

Les principaux caroténoïdes de la Prune d'Ente ont été identifiés (β-carotène, lutéine, violaxanthine et ses isomères, néochrome). L'étude méthodologique a porté sur l'estimation des fractions carotène et xanthophylle. L'évolution de chacune d'elles a été suivie au cours de l'obtention du Pruneau. La dégradation est surtout importante au début du séchage ; 60 p. 100 des pigments disparaissent. Seule la fraction xanthophylle subit une altération notable après trois heures de chauffage. Le mécanisme de la dégradation des caroténoïdes de la Prune d'Ente, ainsi que l'intervention de ces pigments dans la formation de l'arôme du Pruneau d'Agen, sont brièvement discutés.

INTRODUCTION

Divers auteurs ont montré que les pigments caroténoïdes des végétaux sont susceptibles de se dégrader au cours des opérations technologiques nécessaires à leur transformation (séchage, conditionnement...) ou durant leur stockage.

Les xanthophylles jouent un rôle important dans la pigmentation des volailles et du jaune d'œuf ; c'est pourquoi l'étude des caroténoïdes lors de l'obtention des farines de fourrages a retenu plus particulièrement l'attention. Le séchage de la luzerne à 121 °C pendant une heure entraîne des pertes en carotène de l'ordre de 45 p. 100 et en xanthophylle de 60 p. 100 (KOHLER *et al.*, 1967). La diminution de la teneur en caroténoïdes est de 25 p. 100 environ, dans la pratique courante, entre le moment du hachage et celui du séchage (KNOWLES *et al.*, 1968).

La concentration du jus d'orange n'a que peu d'effet sur la composition en caro-

(¹) Prune d'Ente : *Prunus domestica* L. var. d'Ente. Le Pruneau d'Agen est le produit résultant de la déshydratation partielle de la Prune d'Ente (JOURET, MAUGENET et MESNIER, 1971).

ténoïdes. Dans la préparation de la poudre de jus d'orange, une partie des caroténoïdes 5,6-époxydes qui composent environ les 2/3 des pigments sont isomérisés en 5,8. Un stockage pendant six mois à 37°C entraîne pratiquement la disparition de tous les pigments 5,6-époxydes. Aucune perte n'est observée en provitamine A (CURL et BAILEY, 1959). Le séchage a un effet destructif prononcé sur les pigments caroténoïdes de l'écorce d'orange et de tangerine : à 100°C les pertes sont de 40-70 p. 100 pour la Tangerine et de 60-70 p. 100 pour l'Orange. La valeur de l'humidité résiduelle du produit fini influence aussi la dégradation de ces mêmes pigments : plus la déshydratation est poussée, moins on conserve de caroténoïdes (BRADDOCK et KESTERSON, 1974). Ces auteurs observent une stabilité marquée des pigments de l'écorce des Citrus séchés si le stockage a lieu à moins 23°C.

SANDERSON et *al.* (1971) confirment l'altération des caroténoïdes de la feuille fraîche de thé vert pendant les divers stades de la transformation en thé noir, et montrent le rôle des carotènes dans la formation de l'arôme du thé noir. En solution modèle propre à la « fermentation » du thé, des composés volatils sont engendrés à partir du β-carotène lorsque les conditions suivantes sont réunies : les flavanols du thé doivent être oxydés, ensuite le mélange réactionnel doit être amené à siccité.

L'étude sur les caroténoïdes de la Prune d'Ente et du Pruneau d'Agen a été entreprise afin de connaître le devenir des pigments au cours de l'élaboration du pruneau, et d'essayer de définir un rôle éventuel de précurseur d'arôme à ces composés. Au préalable, diverses techniques analytiques ont été testées pour déterminer la méthode la mieux adaptée au matériel végétal considéré.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Matériel végétal*

Les échantillons de la campagne 1972 ont été présentés dans une publication antérieure (MOUTOUNET et JOURET, 1975), ceux de 1974 sont préparés selon le même protocole. Les prunes subissent un triage densimétrique. Des échantillons de 20-25 fruits sont prélevés, au hasard, avant la mise à l'étuve, puis après 10 et 14 heures de chauffage et au moment de l'arrêt du four. Le séchage dure 19 heures. Le Pruneau produit renferme 26 p. 100 d'humidité résiduelle. Les fruits dénoyautés sont immédiatement plongés dans l'azote liquide et chaque échantillon est lyophilisé (la température des produits n'atteint 25°C qu'en fin d'opération).

La poudre de prune lyophilisée brûnit rapidement lorsqu'elle est réhydratée. Pour avoir une idée de l'influence éventuelle de l'intervention de polyphénoloxydases sur la dégradation des caroténoïdes, les pigments sont extraits d'un échantillon de « prune 1974 », au préalable additionné de trois volumes d'eau et agité au contact de l'air pendant 10 mn.

B. — *Méthodes analytiques. Essais de diverses techniques*

1. *Extraction des caroténoïdes, dosage des fractions carotène et xanthophylle.*

Les caroténoïdes se dégradent facilement sous l'action de températures supérieures à 40-50°C, en milieu acide et sous un éclairement intense. Par suite, les évaporations ont été menées sous vide sans que la température du bain dépasse 38°C, les échantillons additionnés de carbonate de calcium avant l'extraction et les analyses ont été conduites en lumière atténuée.

1. 1. *Techniques d'extraction.*

L'acétone est le solvant le plus utilisé pour l'extraction des pigments caroténoïdes (COSTES, 1967 ; DEROCHE, 1971 ; NITSCHE, 1972). FARRE-ROVIRA et COSTES (1974) ont constaté que tous les caroténoïdes d'une semoule de blé dur n'étaient pas extraits par un traitement à l'acétone et ils

ont proposé de compléter cette extraction par du méthanol. Cette technique a été également adoptée par YOKOYAMA et WHITE (1967). De fait, CURL et BAILEY depuis 1959, pour l'étude des pigments des fruits, utilisent le méthanol comme solvant d'extraction. Ces deux solvants ont été testés pour solubiliser les pigments caroténoïdes de la Prune d'Ente.

Il a été également essayé diverses techniques de mise en contact du solvant et du matériel à extraire :

— par percolation : la poudre de prune lyophilisée est mélangée intimement avec un adjuvant de filtration (Celite 545) ;
— par utilisation d'un agitateur à tourniquet : l'extraction se réalise directement dans des tubes à centrifugation ; le surnageant est récupéré après centrifugation à 5 500 *g* pendant 15 mn ;
— au moyen d'un mixer (modèle Waring Blendor modifié) : le solvant est récupéré par filtration sous pression d'azote (appareil Sartorius).

Ces expérimentations ont été réalisées sur 5 grammes d'échantillons lyophilisés de la récolte 1972. Quel que soit le type d'extraction utilisé, les caroténoïdes sont transférés dans l'éther de pétrole avant séparation ou saponification.

1. 2. *Saponification.*

Les chlorophylles présentes dans l'extrait éthéropétrolique perturbent la détermination spectrophotométrique des caroténoïdes. Le traitement alcalin permet d'éliminer les noyaux tétrapyrroliques. Les xanthophylles estérifiées *in vivo* se trouvent ainsi hydrolysées.

Les extraits acétoniques sont traités par une solution de potasse aqueuse à 15 p. 100 pendant douze heures (FARRE-ROVIRA et COSTES, 1974). Les solutions éthéropétroliques sont agitées pendant trois heures avec une solution de potasse méthanolique à 12 p. 100, ou bien les caroténoïdes extraits sont amenés à sec par évaporation et dissous ensuite par de la potasse méthanolique à 12 p. 100 et on laisse agir pendant trois heures. Après saponification, on extrait les pigments par l'éther de pétrole et on complète ce transfert par l'éther éthylique s'il y a lieu.

1. 3. *Techniques de séparation des fractions carotène et xanthophylle.*

Les méthodes qui permettent de séparer les carotènes des xanthophylles font appel soit au partage entre deux solvants non miscibles, soit à l'adsorption sur colonne chromatographique.

1. 3.1. *Partage éther de pétrole/méthanol.*

Selon une technique communiquée par FERRY (1974), on saponifie la solution éthéropétrolique par de la potasse méthanolique à 12 p. 100. Après trois heures d'agitation, l'épiphase renferme les carotènes et l'hypophase les xanthophylles (tabl. 1).

TABLEAU I

Schéma de la méthode de dosage des fractions carotène et xanthophylle indiquée par FERRY (1975)

Extrait éthéropétrolique + potasse méthanolique à 12 p. 100
(agitation 3 heures)

↙ épiphase → FRACTION CAROTÈNE

↘ hypophase → FRACTION XANTHOPHYLLE

L'hypophase est traitée par l'éther de pétrole, jusqu'à ce que l'éther de pétrole reste incolore. Les extraits éthéropétroliques sont ajoutés à l'épiphase. Les pigments hypophasiques sont ensuite transférés dans l'éther éthylique. A chaque manipulation, une faible addition d'eau permet une bonne séparation des phases. La phase éthérée est lavée à l'eau pour éliminer le méthanol et séchée sur sulfate de sodium anhydre.

L'épiphase est traitée plusieurs fois avec du méthanol à 90 p. 100 jusqu'à ce que le méthanol reste incolore. Les extraits méthanoliques sont ajoutés à l'hypophase. La solution éthéropétrolique des pigments est lavée à l'eau puis séchée.

Pour les autres techniques examinées, les transferts s'opèrent de la même manière.

Dans la méthode indiquée par Farre-Rovira et Costes (1974), selon les données de Davies (1965), les xanthophylles sont séparées des xanthophylles estérifiées et des carotènes par partage entre l'éther de pétrole et le méthanol à 95/5 (v/v). Pour éviter la dissolution de l'éther de pétrole dans l'hypophase, le méthanol à 95 p. 100 utilisé est saturé, préalablement, d'éther de pétrole. Par cette technique analytique, on devrait pouvoir distinguer la quantité de xanthophylles estérifiées de la fraction libre (tabl. 2).

TABLEAU 2

Schéma de la méthode de dosage des fractions carotène et xanthophylle indiquée par Farre-Rovira *et* Costes (1974)

Extrait éthéropétrolique

↓

partage éther de pétrole/méthanol à 95 p. 100 saturé d'éther de pétrole

↙ ↘

caroténoïdes épiphasiques (E) = carotènes + xanthophylles « estérifiées »	caroténoïdes hypophasiques (H) = xanthophylles « libres »

1. 3.2. *Chromatographie d'adsorption.*

Les adsorbants utilisés pour les méthodes proposées par l'AOAC pour la séparation des caroténoïdes des végétaux ont été essayés. Il s'agit des mélanges :

silicagel G. (Merck), kieselghur (Merck), 1 + 1
magnésie (Baker), kieselghur (Merck), 1 + 1.

Costes (1958, 1965) a mis au point une technique de dosage des caroténoïdes foliaires après chromatographie sur cellulose. Nous avons utilisé des colonnes de 250 × 12 mm contenant 8 g de poudre de cellulose microcristalline (Merck). Le résidu sec des pigments isolés est transféré sur la colonne par fraction de 500 µl d'éther de pétrole et d'acétone à 2 p. 100 dans l'éther de pétrole utilisés successivement. La fraction carotène est éluée par 20 ml d'éther de pétrole et la fraction xanthophylle par 20 ml d'un mélange éther de pétrole/acétone (80/20, v/v. avec un débit de 5 ml/mn.

1. 4. *Dosage.*

Les fractions séparées sont évaporées à sec et reprises par un volume connu d'éther de pétrole pour les carotènes et d'éthanol pour les xanthophylles. Les densités optiques mesurées au maximum d'absorption sont enregistrées au spectrophotomètre Unicam. La concentration de chaque échantillon est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage établie avec des solutions de β-carotène. Les résultats sont exprimés en mg de β-carotène par kg de matière sèche.

2. *Caractérisation des pigments.*

2. 1. *Spectres d'absorption.*

Les caroténoïdes sont caractérisés par leur spectre d'absorption, de 310 à 700 nm, dans divers solvants, enregistré au spectrophotomètre Unicam modèle SP 1800.

2. 2. *Comportement chromatographique.*

Chromatographie en couche mince.

Les Rf des pigments sont déterminés sur plaque de silicagel G/Ca $(OH)_2$ (1/6 en poids) comparativement aux données de Nelson et Livingston (1967).

La chromatographie en couche mince sur silicagel G (Merck) a été utilisée avec les solvants d'élution suivants :

éther de pétrole/éther éthylique 90/10,
chlorure de méthylène/acétate d'éthyle/acétone 70/30/15.

Chromatographie sur colonne.

Après saponification, les pigments ont été fractionnés sur colonne de cellulose selon le procédé mis au point par COSTES (1958, 1965). Une pompe péristaltique soutire le solvant d'élution de la colonne.

2. 3. *Réactions des groupes époxydes.*

Les xanthophylles époxydées sont converties en leurs isomères furanoxydes en présence d'acide ; ceci se traduit par un déplacement hypsochrome des maximums d'absorption du spectre visible (KARRER et JUCKER, 1950). La réaction au chlorure d'aluminium, étudiée par MONTIES et COSTES (1968), a été également utilisée.

RÉSULTATS

A. — *Choix du protocole expérimental d'analyse*

1. *Extraction.*

TABLEAU 3

Caroténoïdes totaux en fonction du mode d'extraction

Mode d'extraction	Durée	Nature du solvant	Quantité du solvant	Caroténoïdes mg de β-carotène par kg de MS
percolation	28 heures	acétone	500 ml	41,0
agitation et centrifugation	5 × 30 mn	acétone	5 × 120 ml	39,5
agitation et centrifugation	5 × 30 mn 5 × 30 mn	acétone méthanol	5 × 120 ml 5 × 120 ml	59,5
mixer et filtration sous pression	3 × 5 mn	acétone	3 × 150 ml	51,9
mixer et filtration sous pression	4 × 5 mn	méthanol	4 × 150 ml	67,3

Les deux premières méthodes d'extraction donnent des résultats semblables. L'utilisation du méthanol entraîne une bien meilleure extraction des pigments : 50 p. 100 de plus par rapport à l'acétone. L'extraction au moyen du mixer (Waring-Blendor modifié) se montre supérieure aux autres techniques (+ 11 p. 100). De plus, elle est beaucoup plus rapide. La première extraction au méthanol entraîne 77 p. 100 des pigments, la deuxième 20 p. 100.

2. *Séparation de la fraction carotène et de la fraction xanthophylle.*

Le choix s'est fixé sur la séparation sur colonne car cette technique, telle qu'elle a été employée, est plus rapide et de manipulation moins délicate que le partage en ampoule à décanter.

La totalité du β-carotène pur (Fluka) chromatographié sur colonne de cellulose est retrouvée après élution par l'éther de pétrole ; 2,5 p. 100 sont perdus lors du passage sur colonne de magnésie/kieselghur et près de 20 p. 100 sur colonne de silicagel/kieselghur.

3. *Méthode adoptée.*

En fonction des résultats précédents, les pigments de 5 g d'échantillon lyophilisé additionnés de 3 g de $CaCO_3$ sont extraits par 4 fractions de 150 ml de méthanol à l'aide d'un mixer Waring-Blendor dont le récipient a été modifié de façon à éviter les pertes lors du broyage et des transvasements. Le contact du solvant avec la poudre lyophilisée dure 1 mn. Après transfert dans l'éther de pétrole et saponification dans de la potasse méthanolique, les pigments sont chromatographiés sur cellulose (tabl. 4).

TABLEAU 4

Schéma de la méthode analytique utilisée pour le dosage des fractions carotène et xanthophylle de la Prune et du Pruneau

Solution méthanolique (amenée à 100 ml)
↓
Transfert des pigments (3 × 100 ml éther de pétrole
1 × 100 ml éther éthylique)
↓
Évaporation complète des solvants
↓
Saponification
(100 ml de potasse méthanolique à 12 p. 100, agitation : 3 heures)
↓
Transfert des pigments
↓
Évaporation complète des solvants
↓
Dépôt sur colonne de cellulose

/	\
élution par l'éther de pétrole	élution par éther de pétrole/acétone (80/20)
↙	↘
FRACTION CAROTÈNE	FRACTION XANTHOPHYLLE

B. — *Caractérisation des caroténoïdes de la Prune d'Ente*

1. *Séparation des caroténoïdes après saponification.*

La chromatographie sur colonne de cellulose, selon COSTES (1958, 1965) résout le mélange en 4 fractions.

La première fraction éluée par l'éther de pétrole est constituée vraisemblable-

ment de β-carotène. Les propriétés spectrales de cette fraction sont similaires à celles obtenues pour le β-carotène témoin. Sur les différentes chromatographies en couche mince utilisées, les taches du β-carotène témoin et de la fraction éluée par l'éther de pétrole ont le même Rf (tabl. 5).

La deuxième fraction éluée par le mélange éther de pétrole/acétone (97/3) a des caractéristiques spectrales, dans l'éthanol, le benzène, le chloroforme et le sulfure de carbone semblables à celles indiquées par COSTES (1965), EGGER (1968) pour la lutéine. Avec cette fraction, on obtient le même Rf sur chromatoplaque de silicagel G/Ca $(OH)_2$ que celui donné par NELSON et LIVINGSTON (1967) pour la lutéine (tabl. 5). L'addition d'acide chlorhydrique dilué ou de solution de chlorure d'aluminium n'entraîne pas de déplacement des maximums d'absorption.

TABLEAU 5

Chromatographie en couche mince silicagel G/Ca $(OH)_2$ (1/6)

Rf trouvés	Rf donnés par NELSON et LIVINGSTON (1967)	
0,85	β-carotène	0,87
0,60	lutéine.................	0,60
0,35	violaxanthine...........	0,31
0,11	néoxanthine	0,07

La troisième fraction est éluée par le mélange éther de pétrole/acétone (93/7). Le spectre d'absorption dans l'éthanol présente des maximums à 382, 402, 448, 467 nm. Après traitement acide, le spectre d'absorption est identique à l'auroxanthine, isomère de la violaxanthine. Cette fraction est composée de violaxanthine en mélange avec ses isomères : lutéoxanthine et auroxanthine.

La quatrième fraction est éluée par le mélange éther de pétrole/acétone (90/10). Cette fraction a été aussi éluée plus rapidement en utilisant des mélanges contenant 5 p. 100 de plus d'acétone.

Les données du tableau 6 et l'allure des spectres sont semblables à ceux présentés par COSTES (1967) pour le trollichrome identifié dans la fleur de Millepertuis. BUCHECKER *et al.* (1975) signalent que ce pigment est le néochrome.

TABLEAU 6

Maximums d'absorption observés dans la quatrième fraction

Solvant	Maximums d'absorption (nm)		
éthanol	400	423	448
benzène	408	431	459
sulfure de carbone	420	448	479

2. *Les xanthophylles estérifiées.*

La fraction H (tabl. 2) séparée par extraction au méthanol à 95 p. 100 de la solution éthéropétrolique des pigments représente 20 p. 100 des caroténoïdes de la Prune d'Ente.

La chromatographie sur plaque de silicagel de cette fraction montre qu'une partie des pigments se déplace entre le β-carotène et les xanthophylles, et cette tache chromatographique n'est plus apparente si l'échantillon est saponifié. Ce sont donc des xanthophylles qui se trouvent sous forme estérifiée. Ces mêmes pigments sont élués d'une colonne de cellulose avec le mélange éther de pétrole/acétone (97/3) ; l'analyse spectrale a pu montrer qu'il devait s'agir d'esters d'un mélange de violaxanthine et de lutéoxanthine probablement sous forme monoestérifiée puisque ce sont les xanthophylles hydroxylées qui sont hypophasiques dans le mélange éther de pétrole/méthanol (95/5). Les monoesters de violaxanthine passent avec les xanthophylles libres dans le méthanol à 95 p. 100 saturé d'éther de pétrole. C'est donc une faible proportion de xanthophylles qui se trouve à l'état libre, la majeure partie étant estérifiée. Seuls de la lutéine et du néochrome sont retrouvés dans la fraction méthanol à 95 p. 100 à l'état libre.

C. — *Évolution des caroténoïdes au cours de l'obtention du Pruneau*

Pour les deux années de récolte examinées, 1972 et 1974, la fraction xanthophylle représente 75 p. 100 des caroténoïdes de la Prune. Les quantités de caroténoïdes altérés sont grossièrement similaires pour les deux essais. Les prunes 1974 étant plus riches en caroténoïdes, l'altération de ceux-ci, pendant le séchage, est donc proportionnellement moins grande que pour les prunes 1972.

TABLEAU 7

Évolution des caroténoïdes au cours du séchage
(résultats exprimés en mg de β-carotène/kg de MS)

Échantillons	Carotènes	Xanthophylles	Caroténoïdes totaux
Prune (1972)......................	17,2	50,6	67,8
Prune après 3 heures de séchage....	7,3	20,2	27,5
Pruneau (1972)	7,6	9,8	17,4
Quantité dégradée	9,6	40,8	50,4
Pruneau à pulpe noircie (1972)	6,6	10,1	16,8
Prune (1974)......................	28,2	88,5	116,7
Prune après 10 heures de séchage...	19,9	38,5	58,4
Prune après 14 heures de séchage...	20,3	37,2	57,5
Pruneau (1974)	17,3	35,6	52,9
Quantité dégradée	10,9	52,9	63,8

Globalement, pendant le séchage, les pertes en caroténoïdes sont importantes. Les résultats obtenus sur les échantillons 1972 montrent que cette dégradation est surtout élevée pendant les premières heures de chauffage. Au cours de cette période, environ 60 p. 100 des carotènes et des xanthophylles sont dégradés. Par la suite, seule la fraction xanthophylle subit des variations appréciables. L'analyse des échantillons 1974 indique qu'après 10 heures de séchage la teneur en caroténoïdes reste pratiquement inchangée.

Le brunissement de la pulpe du Pruneau n'entraîne pas de modification dans la composition en caroténoïdes (tabl. 7). Par contre, on constate une altération importante de ces pigments lorsqu'on provoque, par réhydratation et exposition à l'air de la poudre lyophylisée, le brunissement de la pulpe de la Prune (tabl. 8).

TABLEAU 8

Modification de la composition en caroténoïdes de la Prune lors du brunissement
(résultats exprimés en mg de β-carotène/kg de MS)

Échantillons	Carotènes	Xanthophylles	Caroténoïdes totaux
Prune (1974)	28,2	88,5	116,7
Même échantillon après brunissement	18,2	51,2	69,4

DISCUSSION

Les caroténoïdes sont sensibles aux dégradations photochimique auto-oxydative et enzymatique (Chichester et McFeeters, 1971). Pour les caroténoïdes de la feuille de luzerne, Walsh et Hauge (1953) estiment que les réactions auto-oxydatives sont mineures au-dessous de 40°C. Lorsque la dégradation est du type enzymatique, généralement la réaction est couplée ; c'est le substrat de l'enzyme à l'état oxydé qui agit sur les pigments caroténoïdes. La présence de lipoxygénase dans certaines conditions entraîne, à partir du linoléate dans une première étape, la formation de peroxyde, qui, ensuite, provoque l'altération des carotènes (Friend, 1958). Ce serait, en particulier, le cas des farines de céréales additionnées de farines de légumineuses, selon le mode de panification (Drapon *et al.*, 1971). En solution synthétique, Elahi et Cole (1964) montrent que l'oxydation du β-carotène par des hydroperoxydes est possible. Dans les feuilles, la deuxième étape pourrait être catalysée par une carotène-oxydase (Kies *et al.*, 1969) ou sous l'action de composés hématiniques (Blain, 1970). Au cours de l'obtention du thé noir, Sanderson *et al.* (1971) ont démontré que les pigments caroténoïdes sont dégradés par oxydation couplée avec les flavanols. L'oxydation des flavanols est sous la dépendance d'une activité catécholoxydasique. L'enzyme et le substrat sont mis en contact par des modifications de perméabilité

cellulaire (SANDERSON, 1968 ; SANDERSON et GRAHAM, 1973). Les concentrations en acides chlorogéniques trouvés par PUECH et JOURET (1974) sont inférieures de 35-40 p. 100 dans les pruneaux comparativement à la teneur dosée dans la Prune d'Ente. Étudiant les acides organiques au sujet du brunissement de différentes variétés de prunes, De MOURA et DOSTAL (1965) évoquent la possibilité de l'existence de polyphénoloxydases pour expliquer les pertes en acide chlorogénique et le brunissement de ces fruits. On a vu que les caroténoïdes de la Prune d'Ente diminuent fortement lorsque les tissus brunissent (tabl. 8). La température interne du fruit atteint 60-65 °C au bout de deux à trois heures selon la technique de séchage pratiquée. L'altération des caroténoïdes de la Prune d'Ente est surtout importante au début du séchage ; après trois heures de chauffage, dans les conditions expérimentales utilisées, les modifications dans la composition en caroténoïdes sont relativement faibles. Il est possible qu'après cette période l'enzyme responsable soit dénaturée.

Ces diverses indications incitent à admettre comme hypothèse que le mécanisme de la dégradation des caroténoïdes de la Prune d'Ente pendant les premières heures du séchage soit une oxydation couplée avec les polyphénols sous l'action d'activité oxydasique.

Les produits de dégradation des caroténoïdes peuvent être des substances volatiles qui interviendraient dans l'arôme. L'odeur particulière prise par les carottes déshydratées stockées en présence d'oxygène a pour origine l'oxydation des carotènes (AYERS *et al.*, 1964). En solution modèle, SANDERSON *et al.* (1971) démontrent le rôle des carotènes dans la formation de l'arôme du thé noir. Les résultats obtenus à partir du β-carotène marqué sont généralisés aux autres caroténoïdes présents dans la feuille de thé. KAWASHIMA et YAMANISHI (1973) identifient, parmi les composés formés à partir du β-carotène, la déhydroactinidiolide ; ce constituant important de l'arôme du thé noir (SAKATO et INA, 1970) se formerait pendant le stade qui suit la « fermentation », stade pendant lequel la température est amenée de l'ambiance à 65 °C puis à 85 °C et le pourcentage d'humidité de 60 à 3 p. 100 (SANDERSON et GRAHAM, 1973). La déhydroactinidiolide a été mise en évidence parmi les composés volatils du Pruneau d'Agen (MOUTOUNET *et al.*, 1975). Quel que soit le type d'installation de séchage utilisé, la température interne des fruits ne dépasse pas 73-74 °C, et en fin d'opération le pourcentage d'humidité du Pruneau se situe autour de 23 p. 100.

Bien que les conditions de dessiccation ne soient pas en tout point comparables avec celles de la technologie du thé noir, il n'est pas exclu que les caroténoïdes de la Prune puissent être des précurseurs de l'arôme du Pruneau. Ce rôle serait déterminant dès le début de l'élaboration du Pruneau d'Agen. La connaissance de l'importance de ces phénomènes, en intensité et en durée, contribuera efficacement à améliorer la qualité de ce produit.

Reçu pour publication en octobre 1975.

SUMMARY

THE CAROTENOIDS OF PLUM AND PRUNE

The principal carotenoïds of plum (*Prunus domestica* L. var. d'Ente) have been identified (β-carotene, luteïn, violaxanthin and its isomers, neochrom). The methodological study has borne upon the estimation of caroten and xanthopyll fractions. The evolution of each of them

has been followed during the prune manufacturing process. The degradation is specially important at the beginning of drying ; 60 p. 100 of these pigments are lost. Only the xanthophyll fraction undergoes a remarkable alteration after three hours of heating. The carotenoids degradation process of plum and the role of these pigments in the prune aroma formation are consisely discussed.

RESUMEN

LOS CAROTENOIDES DE LA CIRUELA DE ENTE Y DE LA CIRUELA PASA DE AGEN

Los principales carotenoides de la ciruela de Ente han sido debidamente identificados (β-caroteno, luteina, violaxantina y sus isómeros, neocromo). El estudio metodológico se ha referido a la estimación de las fracciones caroteno y xantofila. Ha sido seguida la evolución de cada una de estas fracciones durante el transcurso de la obtención de la ciruela pasa. La degradación es importante, sobre todo, al principio del secado : un 60 p. 100 de los pigmentos desaparecen. Unicamente la fracción xantofila sufre una alteración notable después de tres horas de calentamiento. El mecanismo de degradación de los carotenoides de la ciruela de Ente, así como la intervención de estos pigmentos en la formación del aroma de la ciruela pasa de Agen son puestos brevemente en discusión.

RIASSUNTO

LE CAROTENOIDI DELLA PRUGNA D'ENTE E DELLA PRUGNA SECCA D'AGEN

I principali carotenoidi della prugna d'Ente sono stati identificati (β-carotene, luteina, violaxantene e i suoi isomeri, neocromo). L'oggetto dello studio metodologico è stata la valutazione delle frazioni carotene e xantofilla. L'evoluzione di ognuna di esse è stata seguita durante l'ottenimento della prugna secca. La degradazione è soprattutto rilevante all'inizio dell'essiccamento ; 60 p. 100 dei pigmenti spariscono. Solo la frazione xantofilla subisce un'importante alterazione dopo tre ore di riscaldamento. Il meccanismo della degradazione dei carotenoidi della prugna d'Ente come pure l'intervento di questi pigmenti nella formazione dell'aroma della prugna d'Agen sono infine brevemente discussi.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ayers J. E., Fishwick M. J., Lang D. G., Swain T., 1964. Off-flavour of dehydrated carrot stored in oxygen. *Nature, London*, **203**, 81-82.

Blain J. A., 1970. Carotenoid bleaching activity in plant tissue extracts. *J. Sci. Food Agric.*, **21**, 1-35.

Braddock R. J., Kerterson J. W., 1974. Stabilization of carotenoids in dried citrus flavedo. *J. Food Sci.*, **39**, 712-714.

Buchecker R., Liaaen-Jensen S., Eugster C. H., 1975. The identity of trollixanthin and trolliflor with neoxanthin. *Phytochem.*, **14**, 797-799.

Chichester C. O., McFeeters R., 1971. Pigment degeneration during processing and storage. In Hulme A. C., *The biochemistry of fruits and their products*, **2**, 708-711. Academic Press, New York and London.

Costes C., 1958. Séparation et dosage des caroténoïdes foliaires par chromatographie sur cellulose. *Ann. Agron. Sup.*, IA, 35-48.

Costes C., 1965. *Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des caroténoïdes dans les feuilles.* Thèse de Doctorat. Université de Paris, Orsay, I. N. R. A., éditeur.

Costes C., 1967. Pigments caroténoïdes des pétales de la fleur de millepertuis, *Hyperricum perforatum*. *Ann. Physiol. vég.*, **9** (2), 157-177.

Curl A. L., Bailey G. F., 1959. Changes in the carotenoid pigments in preparation and storage of valencia orange juice powder. *Food Technol.*, **13** (7), 394-398.

Curl A. L., Bailey G. F., 1961. An improved test for carotenoid epoxides. *J. Agr. Food Chem.*, **9**, 403-405.

Davies B. H., 1965. Analysis of carotenoid pigments. In Goodwin T. W., *Chemistry and biochemistry of plant pigments*, 489-532. Acad. Press, Londres.

Deroche M. E., 1971. Amélioration de la séparation chromatographique des pigments liposolubles en carotène, xanthophylles et chlorophylles. *Chim. anal.*, **53**, 704-709.

Drapon R., Beaux Y., Cormier M., Geffroy J., 1971. Sur l'oxydation enzymatique des tocophérols et des pigments caroténoïdes au cours de la panification. *C. R. Acad. Agr.*, 245-251.

Egger K., 1968. Zur Identität von Taraxanthin und Luteinepoxid. *Planta*, **80**, 65-79.

Elahi H., Cole E. R., 1964. Oxidation of β-carotene by hydroperoxydes. *Nature, London*, **203**, 186-187.

Farre-Rovira R., Costes C., 1974. Les caroténoïdes des farines et semoules de blé. *Physiol. vég.*, **12** (2), 251-288.

Ferry, 1974. Communication personnelle.

Friend J., 1958. The coupled oxidation of β-carotene by linoleate-lipoxidase system and by autoxidizing linoleate. *Chem. Indus.*, **18**, 597-598.

Jouret C., Maugenet J., Mesnier Y., 1971. La technologie du Pruneau d'Agen. *Revue de la Conserve*, **10**, 101-107.

Karrer P., Jucker E., 1950. *Carotenoids*. Elsevier Publishing Co, Inc, New York, N. Y.

Kawashima K., Yamanishi T., 1973. *Nippon nogei kagaku kaishi*, **47**, 79 ; cité par Sanderson et Graham, 1973.

Kies M. W., Haining J. L., Pistorius E., Schoeder D. H., Axelrod B., 1969. On the question of the identity of soybean « lipoxidase » and carotene oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **36**, 312-315.

Knowles R. E., Livingston A. L., Nelson J. W., Kohler G. O., 1968. Stabilization of carotenoids by ethoxyquin in harwested fresh alfalfa. *J. Agr. Food Chem.*, **16** (6), 985-989.

Nowles G. O., Knowles R. E., Livingston A. L., 1967. An improved analytical procedure for the determination of xanthophyll. *J. A. O. A. C.*, **50** (3), 707-711.

Monties B., Costes C., 1968. Propriétés des caroténoïdes chloroplastiques : réaction de la violaxanthine et du chlorure d'aluminium. *C. R. Acad. Sc.*, **266** C, 481-484.

De Moura J., Dostal D. C., 1965. Browning in fruits. Nonvolatile acids of Prunes. *J. Agr. Food Chem.*, **13** (5), 433-435.

Moutounet M., Jouret C., 1975. Les acides aminés de la Prune d'Ente et du Pruneau d'Agen. *Fruits*, **30** (5), 345-348.

Moutounet M., Dubois P., Jouret C., 1975. Les composés volatils majeurs du Pruneau d'Agen. *C. R. Acad. Agri. Fr.*, séance du 28 mai.

Nelson J. W., Livingston A. L., 1967. Stabilization of xanthophyll and carotene by ethoxyquin during thin-layer chromatography. *J. Chromat.*, **28**, 465-467.

Nitsche H., 1972. Mimulaxanthine, a new allenic xanthophyll from the petals of *Mimulus guttatus*. *Phytochem.*, **11**, 401-404.

Puech J.-L., Jouret C., 1974. Les acides à noyau aromatique de la Prune d'Ente et du Pruneau d'Agen. *C. R. Acad. Agr. Fr.*, 92-96.

Sakato M., Ina K., 1970. Chagyo kenkyo hokoku shiryo, 2, 1 ; cité par Sanderson et Graham, 1973.

Sanderson G. W., 1968. Change in cell membrane permeability in the flush on storage after plucking and its effect on fermentation in tea manufacture. *J. Sci. Food Agric.*, **19** (10), 637-639.

Sanderson G. W., Co H., Gonzalez J. G., 1971. Biochemistry of tea fermentation : the role of carotenes in black tea aroma formation. *J. Food Sci.*, **36** (2), 231-236.

Sanderson G. W., Graham H. N., 1973. On the formation of black tea aroma. *J. Agr. Food Chem.*, **21** (4), 576-585.

Walsh K. A., Hauge S. M., 1953. Carotene, factors affecting destruction in alfafa. *J. Agr. Food Chem.*, **1** (16), 1001-1004.

Yokoyama H., White M., 1967. Carotenoids in the flavedo of marsh seedless grapefruit. *J. Agr. Food Chem.*, **15** (4), 693-696.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (1), 85-95.

INFLUENCE DES TRAITEMENTS THERMIQUES SUR LA NATURE DES CONSTITUANTS VOLATILS DE LA TOMATE

S. SECK, J. CROUZET et Marie-Thérèse PIVA

Laboratoire de Biochimie appliquée,
Université des Sciences et Techniques du Languedoc,
34060 Montpellier Cedex

RÉSUMÉ

Les modifications introduites au niveau des constituants volatils par les traitements thermiques lors de la préparation de jus de tomates à l'échelle industrielle ont été étudiées en couplage chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse et par voie chimique. Lors de la préparation de ces jus, on assiste à la diminution ou à la disparition des composés responsables de la note fraîche (alcools ou aldéhydes à chaîne courte). On observe, par ailleurs, la formation de produits que l'on rencontre dans différents aliments ayant subi un traitement thermique (dérivé du furanne ou composés benzéniques).

Les dosages de composés carbonylés totaux confirment qu'il y a une perte importante de ces constituants lors de la préparation de tels jus.

Mots clés : *tomate, composés volatils, arôme, chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse.*

INTRODUCTION

Si les données relatives aux constituants volatils de la tomate fraîche sont relativement nombreuses (on trouvera dans les articles de KAZENIAC et HALL (1970) et BUTTERY *et al.* (1971) une revue des travaux antérieurs), celles concernant ces mêmes constituants après traitement sont beaucoup moins nombreuses et plus fragmentaires.

SPENCER et STANLEY (1945) signalent que, bien que le jus frais et le jus traité aient tous deux une odeur de tomate, ils possèdent une odeur différente, le rendement en composés à point d'ébullition élevé étant supérieur dans le second cas.

GINNETTE *et al.* (1963) donnent des aromagrammes de différents produits, jus

brut, jus en conserve, concentré, tomate déshydratée, qui montrent un appauvrissement progressif en constituants volatils. Ces résultats sont purement quantitatifs et aucune identification n'a été faite.

Les travaux de MIERS (1966), WONG et CARSON (1966), GUADAGNI (1968), ont permis de mettre en évidence, dans les tomates et les jus de tomates en conserve, la formation de composés sulfurés (sulfures d'hydrogène et de méthyle), d'identifier le précurseur de ce dernier composé et de préciser le rôle du sulfure de méthyle sur la flaveur des jus de tomates en conserve.

GIANNONE et BALDRATI (1967) suivent les variations des constituants volatils au cours du processus de concentration et notent une diminution de tous les composés à l'exception de ceux ayant même temps de rétention que le sulfure de méthyle, l'acétone et un produit non identifié.

Les résultats obtenus par JOHNSON *et al.* (1968) montrent que les pertes en cours de traitement dépendent de la variété et des constituants, le *cis*-hexène-3 ol étant plus sensible à cet égard que les alcools saturés isopentanol ou *n*-pentanol.

Selon NELSON et HOFF (1969), les concentrations en acétaldéhyde, acétone, méthanol et hexanal sont modifiées d'une manière importante par le traitement. Ces auteurs confirment la formation du sulfure de méthyle par voie thermique.

Une partie du travail de MILUTINOVIC *et al.* (1970) est consacrée à l'étude de l'effet d'acidulants, tels que les acides citrique et malique, sur les composés volatils des tomates en conserve. Cependant, aucune détermination n'est faite, les auteurs se bornant à noter les différences quantitatives entre certains composés repérés par leur ordre d'élution.

BUTTERY *et al.* (1971) notent que l'extraction des constituants volatils à 100°C sous pression atmosphérique se traduit par une augmentation considérable de la proportion de linanol et d'α-terpinéol. Le fait que le premier de ces constituants possède un seuil de perception relativement bas (6 mg/t) en ferait un élément de la flaveur de la tomate.

Enfin, REYMOND (1971) montre que des jus préparés selon des techniques différentes (« cold break », « activated break », « hot break ») donnent des chromatogrammes nettement différents dans la région correspondant aux temps de rétention des hexènols et des hexènals qui apporteraient une contribution importante à la note fraîche, en particulier le *cis*-hexène-3 al (GUADAGNI *et al.*, 1972).

Nous avons, au cours du présent travail, étudié des constituants volatils d'un extrait préparé à partir d'un jus de tomates industriel afin de tenter de préciser l'influence des traitements sur la nature des produits présents.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Matière première*

Il s'agit d'un jus industriel du commerce préparé comme suit : lavage et triage des fruits, chauffage à 62°C, broyage des fruits, préchauffage à 90°C pendant 10 à 18 minutes, tamisage, addition de chlorure de sodium à raison de 7 g par litre, pasteurisation à 110°C pendant 30 secondes, mise en boîte à chaud (95°C). Les boîtes ont été conservées pendant 6 mois dans des conditions non contrôlées.

Les jus non traités ont été préparés à partir de fruits des variétés *Heinz 1350* et *1706*, *Roma V. F.*, *Campbell* et *Saint-Pierre*. Ils ont été obtenus à froid, à l'aide d'une pulpeuse semi-industrielle qui élimine pulpe et pépins. Les jus ainsi obtenus ont été stockés à —20°C dans des bidons vernissés pendant 2 mois.

B. — *Isolement et concentration des constituants volatils*

Les composés volatils destinés à l'étude en CPV ont été obtenus après traitement en circuit fermé dans un appareil de type cyclone opérant sous vide, analogue à celui décrit par Cobb (1969) et que nous avons modifié en y ajoutant un dispositif de recyclage. Le distillat aqueux, recueilli après deux heures de traitement à 60°C par piégeage à l'aide du mélange glace-sel, est extrait trois fois au moyen de chlorure de méthylène, séché sur sulfate de sodium anhydre et le maximum de solvant est éliminé sous un léger courant d'azote. Après extraction au chlorure de méthylène et évaporation sous azote, 30 litres de jus donnent environ 2 ml de concentré renfermant approximativement 50 p. 100 de solvant. Pour le dosage des composés carbonylés totaux, nous avons utilisé le dispositif de Barrera *et al.* (1967) qui permet de travailler par entraînement avec un gaz inerte (azote). Nous avons limité au maximum les quantités d'eau entraînées, afin de favoriser la formation ultérieure des dinitro-2,4 phénylhydrazones (2,4 DNP), en plaçant un réfrigérant entre le ballon et le train de pièges. Le premier piège, maintenu à température ambiante, renferme une solution de dinitro-2,4 phénylhydrazine (2,4 DNPH) (Dinsmore et Nagy, 1971), les deux suivants sont refroidis à l'azote liquide.

C. — *Chromatographie en phase gazeuse*

Nous avons utilisé un appareil Varian-Aerograph modèle 1700 équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. La colonne en acier inoxydable de 10 pieds de long et de 1/8 de pouce de diamètre intérieur était garnie de Carbowax 20-M à 1,5 p. 100 sur chromosorb W 60-80 mesh. Nous avons programmé la température entre 50 et 170°C à une vitesse de 2°C par minute et les débits de gaz porteur (azote), d'hydrogène et d'air étaient respectivement de 40, 35 et 400 ml/mn.

D. — *Couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrographie de masse*

Il était réalisé à l'aide d'un chromatographe Perkin-Elmer 880 couplé à un spectrographe de masse Varian Mat type CH 5 par l'intermédiaire d'un séparateur d'hélium. La température de la source était de 250°C ; tous les spectres ont été enregistrés à 70 eV. Nous avons utilisé une colonne identique à celle employée en chromatographie analytique.

E. — *Identification des composés*

Les composés ont été identifiés soit en comparant leur spectre avec des spectres de référence publiés par ailleurs, soit après analyse des mécanismes de fragmentation.

Chaque fois que cela a été possible, nous avons confirmé les résultats obtenus en spectrographie de masse en comparant les temps de rétention des produits présents dans le mélange à ceux d'échantillons authentiques, chromatographiés dans les mêmes conditions. En cas d'ambiguïté, nous avons procédé à des expériences de cochromatographie.

Les échantillons authentiques provenaient soit de sources commerciales, soit de synthèses réalisées par des méthodes classiques dans d'autres laboratoires ou par nous-même.

F. — *Formation et dosage des dinitro-2,4 phénylhydrazones*

Nous avons utilisé des solvants décarbonylés selon Sanders et Schubert (1971). Un gramme de 2,4 DNPH recristallisée dans du méthanol décarbonylé est dissous dans 70 ml de méthanol décarbonylé, 20 ml d'eau bidistillée, 10 ml d'HCl Merck.

Le contenu des différents pièges est placé dans un bain-marie à 70°C pendant une heure en présence d'un volume égal de la solution précédente (Sanders et Schubert, 1971).

Les 2,4 DNP ont été dosées selon la méthode de LAPPIN et CLARK (1951). La solution contenant le mélange des 2,4 DNP est alors versée dans une fiole jaugée de 250 ou 500 ml (selon les quantités d'eau entraînées) et complétée au volume avec du méthanol décarbonylé. De 1 à 3 ml de cette solution sont prélevés, on complète éventuellement à 3 ml avec ce même solvant, on ajoute alors 5 ml de potasse méthanolique à 10 p. 100 et 5 ml d'eau bidistillée. Au bout de 10 minutes, on effectue la lecture à 480 nm contre un témoin de 2,4 DNPH. Les résultats sont exprimés en µmoles d'acétone par litre de produit ($\varepsilon_{max} = 2{,}03 \cdot 10^4$).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les concentrés organiques résultant de l'extraction au chlorure de méthylène du condensat obtenu après traitement du jus dans un appareil de type cyclone ont été injectés, sans fractionnement préalable, dans le système chromatographie en phase gazeuse-spectrographe de masse et les produits identifiés sur la base de leur spectre de masse (SM).

Le chromatogramme analytique obtenu sur une colonne identique à celle utilisée dans les expériences de couplage est donné figure 1.

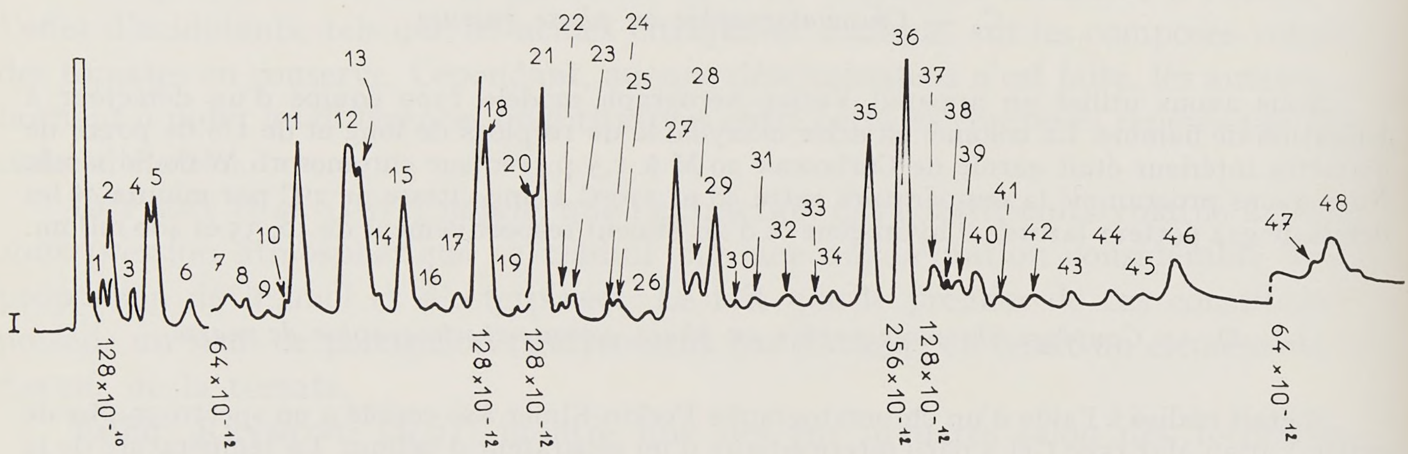


FIG. 1. — *Chromatogramme des composés volatils du jus industriel*

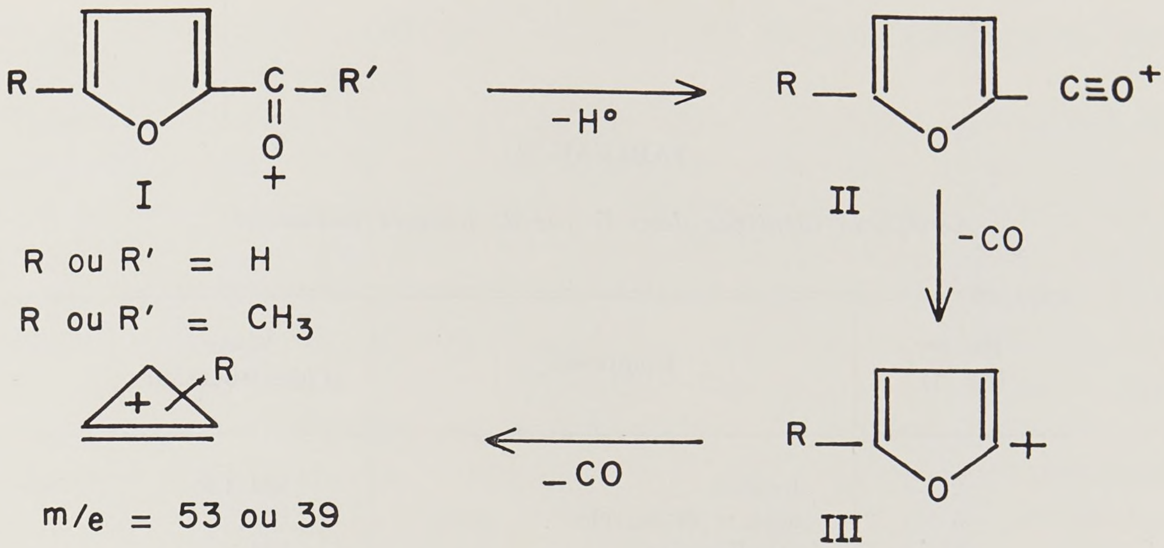
Sur le spectre de masse du composé 12, on note que le pic de base est à $m/e = 31$, il s'agit donc d'un alcool primaire, cependant une identification plus précise n'est pas possible du fait de l'absence de pic net à $(M - 18)^+$.

Le pic 15 correspond à un dérivé substitué du benzène, la présence d'un pic de base à $91 = 119 - (2 \times 14)$ indique la présence de ramifications sur le carbone en α du cycle. De plus, le fragment à $m/e = 91$ $(C_6H_5CH_2)^+$ montre qu'il s'agit d'un dérivé disubstitué du benzène. Le pic parent à $m/e = 134$ plaide en faveur d'un isomère du cymène.

Les composés portant sur le chromatogramme les n° 18, 20, 24, 26, 27 présentent un pic à $m/e = 39$ (18, 20, 27) ou à $m/e = 53$ (24, 26) correspondant à l'ion IV.

$$R = H \qquad m/e = 39,$$
$$R = CH_3 \qquad m/e = 53.$$

Par conséquent, les composés ci-dessus doivent être des dérivés du furanne. En effet, HEYNS *et al.* (1966) et GRIGG *et al.* (1965) ont montré que l'on observait pour les composés de ce type les fragmentations ci-dessous :



Dans ces conditions, nous avons pu faire les attributions suivantes (tabl. 1).

L'identification des différents composés déterminés par l'analyse des spectres de masse a été confirmée, chaque fois que cela a été possible, par la comparaison des temps de rétention (TR) des constituants du mélange à ceux de produits purs (tabl. 2).

Si on compare le chromatogramme d'un tel jus, obtenu après traitement mécanique des fruits à chaud, à celui que donne un jus préparé par broyage des fruits à température ordinaire, on constate un certain nombre de différences sur le plan qualitatif et quantitatif. A titre indicatif, nous donnons (fig. 2 et tabl. 3) les résultats obtenus avec la variété *Heinz 1706*.

TABLEAU I

Dérivés du furanne identifiés dans le jus de tomates industriel

Pic n° (fig. 1)	m/e	Constituant
18	39, 96 (M^+), 95, 38	furfural
20	95, 73, 39, 110 (M^+), 96	acétyl-2 furanne
24	53, 110 (M^+), 109, 43	méthyl-5 furfural
26	109, 81, 124 (M^+), 53, 43	méthyl-5 acétyl-2 furanne
27	39, 98 (M^+), 31, 67, 80	alcool furfurylique

On observe, dans le cas du jus industriel, soit la disparition, soit une diminution importante d'un certain nombre des constituants les plus volatils : butanol, pentanol, méthyl-3 butanol, hexanol, isomères des hexènals et hexènols, hexanal, heptanal.

Nous avons pris comme indice des pertes de constituants volatils intervenant au cours de ce type de processus les pertes en composés carbonylés totaux analysés selon LAPPIN et CLARK (1951).

Les résultats obtenus avec différents types de jus sont consignés dans le tableau 4.

Ces données confirment celles fournies par la chromatographie en phase vapeur et montrent l'importance des pertes en composés carbonylés ; or on sait que ceux-ci

TABLEAU 2

Composés identifiés dans le jus de tomates industriel

Pic n° (fig. 1)	Composés	Mode d'identification
2	toluène	SM-TR
3	acétate de butyle	SM
4	éthylbenzène	SM
5	*p*-xylène	SM-TR
6	*m*-xylène	SM-TR
7	méthyl-3 butanol	SM
9	méthyl-6 heptène-5 one-2	SM
12	alcool primaire	SM
15	dérivé substitué du benzène	SM
18	furfural	SM-TR
20	acétyl-2 furanne	SM-TR
21	benzaldéhyde	SM-TR
24	méthyl-5 furfural	SM-TR
26	méthyl-5 acétyl-2 furanne (1)	SM-TR
27	alcool furfurylique	SM-TR
28	phénylacétaldéhyde	SM-TR
35	alcool benzylique	SM-TR
36	phényl-2 éthanol	SM-TR
42	*p*-anisaldéhyde	SM-TR
48	isopropyl anisole	SM

(1) Signalé pour la première fois parmi les constituants volatils de la tomate.

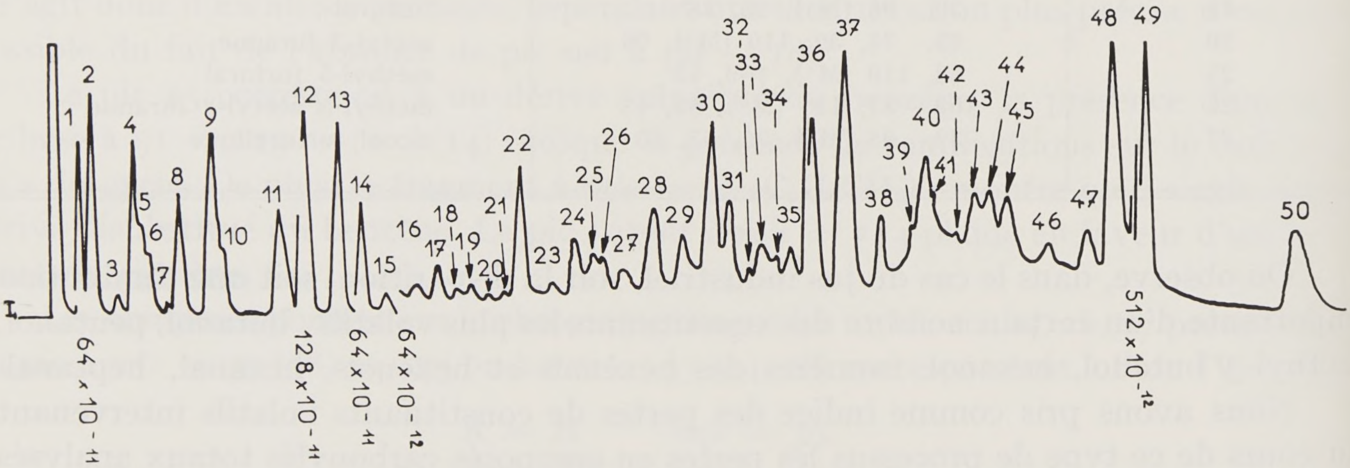


FIG. 2. — *Chromatogramme des composés volatils de* Heinz 1706

jouent un rôle essentiel au niveau de l'arôme des jus frais (SPENCER et STANLEY, 1954 ; GUADAGNI *et al.*, 1972).

KAZENIAC et HALL (1970) ont montré qu'en chauffant des tomates intactes pendant 1 heure à 65°C on diminuait d'une façon considérable la quantité de *n*-hexanal et de *cis*-hexène-3 al que l'on peut isoler après broyage et traitement des fruits. De même, REYMOND (1971) signale que le chauffage des fruits à environ 80°C avec extraction du jus (« hot break ») conduit à la formation de quantités d'hexènals et d'hexènols inférieures à celles que l'on observe lorsque le jus est préparé après broyage des fruits à 40°C (« activated break ») ou à température ambiante (« cold break »). Selon ces deux auteurs, ces différences pourraient provenir de l'inactivation des systèmes enzymatiques responsables du développement de ces composants qui déterminent en partie la note fraîche de la tomate (VIANI *et al.*, 1969 ; KAZENIAC et HALL, 1970). De plus, ces constituants très volatils pourraient se trouver éliminés par évaporation, en particulier, lors du préchauffage qui précède le tamisage et la mise en boîte.

TABLEAU 3

Composés identifiés dans le jus de tomates non traité
(Variété *Heinz 1706*)

Pic n° (fig. 2)	Composés	Mode d'identification
2	toluène	SM-TR
3	acétate de butyle	SM
4	butanol	SM-TR
8	pentanol	TR
9	hexènal	SM-TR
10	acétoïne	SM
11	hepténal	SM-TR
12	hexanol	SM-TR
	méthyl-6 heptène-5 one-2	SM-TR-RMN
13	*cis*-hexène-3 ol-1	SM-TR-RMN
14	*trans*-hexène-2 ol-1	SM
15	dérivé substitué du benzène	SM
19	furfural	SM-TR
22	acétyl-2 furanne	SM-TR
25	méthyl-5 furfural	SM-TR
28	alcool furfurylique	SM-TR
30	dérivés terpéniques	SM
35	gaïacol	SM
36	acétate d'alcool terpénique	SM
37	diméthyl-2,6 undécadiène-2,6 one-10	SM
	+ alcool benzylique	SM-TR
38	phényl-2 éthanol	SM-TR
45	*p*-anisaldéhyde	SM-TR
47	eugénol	SM
50	*p*-vinylphénol	SM

Inversement, certains constituants présents dans les jus frais en faible quantité se retrouvent en plus grande proportion dans le jus industriel : toluène, éthylbenzène, *p*- et *m*-xylène, furfural, acétyl-2 furanne, méthyl-5 furfural, alcool furfurylique,

alcool benzylique et phényl-2 éthanol. Enfin, d'autres constituants, méthyl-5 acétyl-2 furanne, benzaldéhyde, phénylacétaldéhyde, ne sont détectables que dans le jus industriel. Un certain nombre de ces composés sont cités par FRAGERSON (1969) comme étant des produits formés par dégradation thermique des sucres, dans des conditions, certes, plus sévères que celles utilisées lors de la fabrication des jus (pyrolyse à des températures allant de 150 à 300 et même 500°C).

TABLEAU 4

Influence des traitements sur la teneur en composés carbonylés totaux

Type de jus	Concentration en composés carbonylés (µmoles d'acétone/litre)
Jus frais *Heinz 1350*	164
Jus frais *Saint-Pierre*	192
Jus industriel	44
Jus reconstitué à partir de concentré	8

Par ailleurs, les dérivés du furanne identifiés dans le présent travail ont été également mis en évidence par FERETTI *et al.* (1970) parmi les produits formés au cours du brunissement non enzymatique d'un système modèle lactose-caséine conservé pendant 8 jours à 80°C à une humidité relative de 85 p. 100.

Enfin, TATUM (1969) a montré que certains de ces composés (furfural, acétyl-2 furanne, alcool furfurylique), connus comme étant produits lors du processus de brunissement non enzymatique de jus d'orange déshydraté, se forment aussi lors de la dégradation en milieu aqueux de l'acide ascorbique.

Il est logique de penser que dans le cas des jus de tomates industriels les produits signalés ci-dessus sont formés lors des différents traitements thermiques auxquels ont été soumis ces jus. Les précurseurs des composés furanniques, y compris le méthyl-5 acétyl-2 furanne que nous avons trouvé uniquement dans les extraits provenant du jus industriel, sont soit l'acide ascorbique, soit les sucres.

Le phényl acétaldéhyde signalé par RYDER (1966), VIANI *et al.* (1969), KAZENIAC et HALL (1970) pourrait provenir, ainsi que le suggèrent ces auteurs, de la phénylalanine par la voie de la dégradation de STRECKER. Cette hypothèse est également retenue par NURSTEN et WOOLF (1972) pour expliquer la présence de cet aldéhyde parmi les composés volatils qui se forment au cours de la cuisson des pommes. Quant au benzaldéhyde signalé par divers auteurs parmi les composés volatils de la tomate, il pourrait se former par dégradation du phényl acétaldéhyde (NURSTEIN et WOOLF, 1972). Il faut donc conclure que ces différents constituants ne contribuent pas à l'arôme de la tomate fraîche et qu'il s'agit, dans le cas des extraits aromatiques provenant de jus frais, d'artefacts formés lors du processus d'extraction ou par fermentation intracellulaire.

Par ailleurs, nous notons parmi les constituants volatils isolés du jus industriel la présence de trois couples de dérivés carbonylés : furfural — alcool furfurylique,

phénylacétaldéhyde — phényl-2 éthanol, benzaldéhyde — alcool benzylique. L'un des deux constituants de ces couples étant selon toute vraisemblance formé au cours d'une réaction de chauffage, il est exclu qu'une NAD^{+} oxydo-réductase puisse intervenir dans le passage du composé oxydé au composé réduit (ou inversement). On est donc conduit à envisager la possibilité d'une réaction d'oxydo-réduction purement chimique, permettant le passage d'une forme à l'autre, lors du stockage. Cette hypothèse serait en accord avec les observations de NELSON et HOFF (1969) qui signalent qu'au cours du stockage la concentration des composés carbonylés décroît avec le temps, alors que celle des alcools augmente, les conditions d'oxydo-réduction étant réalisées à l'interface étain-acides organiques.

CONCLUSION

Les résultats que nous avons obtenus montrent que les traitements thermiques auxquels sont soumis les jus de tomates au cours des processus industriels contribuent à modifier qualitativement et quantitativement les constituants volatils que l'on peut isoler à partir du produit. Certaines modifications peuvent également intervenir en cours de stockage et il conviendrait d'en préciser l'importance.

Il reste, par ailleurs, à étudier la contribution des différents constituants isolés à l'arôme du produit traité.

Reçu pour publication en octobre 1975.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. MOTEMPS, Directeur de la Station expérimentale de Puyricard, qui nous a fourni les échantillons de fruits nécessaires à cette étude, ainsi que MM. P. DUBOIS, G. BRULÉ et J. RIGAUD, Station de Technologie des Produits végétaux de Dijon I.N.R.A., qui nous ont permis de réaliser les expériences de couplage CPV-SM et nous ont aidé dans l'interprétation des spectres.

SUMMARY

INFLUENCE OF HEAT TREATMENTS ON THE NATURE OF TOMATO VOLATILE COMPOUNDS

The modifications of the volatile compounds induced by heat treatments during the industrial preparation of tomato juice have been studied in coupling gas chromatography and mass spectrometry and through chemical analysis. During the preparation of these juices, a reduction or a disappearing of the compounds responsible for the fresh taste (short-chain alcohols or aldehydes) is observed. Besides there is a formation of products to be found in various aliments submitted to a heat treatment (furan by-product or benzene compounds).

The titration of total carbonyl compounds proves that there is an important loss of these constituents during the preparation of such juices.

RESUMEN

INFLUENCIA DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS SOBRE EL GÉNERO DE LOS COMPONENTES VOLATILES DEL TOMATE

Las modificaciones introducidas a nivel de los componentes volátiles con motivo de los tratamientos térmicos que intervienen durante la preparación del zumo de tomate a escala industrial, han sido estudiadas en acoplamiento cromatografía de fase gaseosa-espectrometría de masa y por vía química. Se asiste, durante la preparación de estos zumos, a la disminución o la desaparición de los compuestos responsables de la nota fresca (alcoholes o aldehidos de cadena corta). Por otra parte, se observa la formación de productos existentes en distintos alimentos que han sido sometidos a un tratamiento térmico (derivado del furano o compuestos bencénicos.)

Las dosificaciones de compuestos carbonilos totales confirman la existencia de una parte importante de estos componentes durante la preparación de dichos zumos.

RIASSUNTO

INFLUENZA DEI TRATTAMENTI TERMICI SULLA NATURA DEI COSTITUENTI VOLATILI DEL POMODORO

Le modifiche apportate al livello dei costituenti volatili dai trattamenti termici durante la preparazione del succo di pomodori su scala industriale, sono state studiate con abbinamento gas-cromatografia e spettrometria di massa e per via chimica. Al momento della preparazione di questi succhi, si osserva la diminuzione o la sparizione dei compostii che danno origine alla nota fresca (alcooli o aldeidi a catena corta). Si nota, d'altra parte, la formazione di prodotti che si incontrano in vari alimenti che hanno subito un trattamento termico (derivato del furano o composti benzenici).

I dosaggi di composti carbonilici totali confermano che vi è una rilevante perdita di questi costituenti durante la preparazione di tali succhi.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Barrera R., de la Cruz F., Gasco L., Manero J., 1967. Effects of irradiation on the volatile components of fruit juices. I. First results from apple and grape juices. *Seiberdsdorf project report.*

Buttery R. G., Seiffert R. M., Guadagni D. G., Ling L. C., 1970. Characterisation of additional volatile components of tomato. *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 524-529.

Cobb W. Y., 1969. Quantitation of flavorful food components using isotope dilution. *J. Food Sci.*, **34**, 466-469.

Dinsmore H., Nagy S., 1971. A rapid gas chromatographic method of studying volatile carbonyls compounds from orange juice and their changes during storage. *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 517-519.

Ferretti A., Flanagan V. P., Ruth J. M., 1970. Nonenzymatic browning in a lactose-casein model system. *J. Agr. Food Chem.*, **18**, 13-18.

Fragerson I. S., 1969. Thermal degradation of carbohydrates. *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 747-750.

Heyns K., Slute R., Scharmann H., 1966. Massenspektrometrische Untersuchungen. XII. Die Massenspektren von furanen. *Tetrahedron*, **22**, 2223-2235.

Johnson J. H., Gould W. A., Badenhop A. F., Johnson R. M. Jr, 1968. Quantitative comparison of isoamylol, pentanol and-3-hexenol-1 in tomato juice. Varietal and harvest differences and processing effects. *J. Agr. Food Chem.*, **16**, 255-258.

Giannone L., Baldrati G., 1967. I costituenti volatili dell'aroma del pomodoro. *Ind. Conserve* (Parma), **42**, 86-93.

Ginnette L. F., Graham R. P., Miers J. C., Morgan A. I. Jr, 1963. Tomato powder by foam-mat drying. *Food Technol.*, **17**, 133-135.

GRIGG R., SARGENT M. V., WILLIAMS D. H., KNIGHT J. A., 1965. Studies in mass spectroscopy. II. Mass spectra of substituted furans. *Tetrahedron*, **21**, 3441-3453.

GUADAGNI D. G., MIERS J. C., VENSTRON D. W., 1968. Methyl sulfide concentration, odor intensity and aroma quality in canned tomato juice. *Food Technol.*, **22**, 71-74.

GUADAGNI D. G., BUTTERY R. G., VENSTRON D. W., 1972. Contribution of some volatile tomato components and their mixtures to fresh tomato aroma. *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 1445-1450.

KAZENIAC S. J., HALL R. M., 1970. Flavor chemistry of tomato volatiles. *J. Food Sci.*, **35**, 519-530.

LAPPIN G. R., CLARK L. C., 1951. Colorimetric method for determination of traces of carbonyl compounds. *Anal. Chem.*, **23**, 541.

MIERS J. C., 1966. Formation of volatile sulfure compounds in processed tomato products. *J. Agr. Food Chem.*, **14**, 419-423.

MILUTINOVIC L., BARGMANN R. E., CHANG K. Y., CHASTAIN M., POWERS J. J., 1970. Comparison of flavor and volatiles of tomato products and of peanuts. *J. Food Sci.*, **35**, 224-228.

NELSON P. E., HOFF J. E., 1960. Tomato volatiles : effect of variety, processing and storage time. *J. Food Sci.*, **34**, 53-57.

NURSTEN H. E., WOOLFE M. L., 1972. An examination of the volatile compounds present in cooked *Bramley's* seedling apples and the change they undergo on processing. *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 803-822.

REYMOND D., 1971. Analytical evaluation of food quality. *Food Technol.*, **25**, 78-82.

RYDER W. S., 1966. Progress and limitations in the identification of flavor components in flavor chemistry, 70-93. *Advances in Chemistry series.* Am. Chem. Soc., Publications. Washington D.C.

SANDERS E. B., SCHUBERT J., 1971. Spectrophotometric analysis of carbonyl compounds in the presence of carbohydrates without prior separation. *Anal. Chem.*, **43**, 59-62.

SPENCER M. S., STANLEY W. L., 1954. Flavor and odor components in the tomato. *J. Agr. Food Chem.*, **2**, 1113-1118.

TATUM J. H., SHAW P. E., BERRY R. E., 1969. Degradation products of ascorbic acid. *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 38-40.

VIANI R., BRICOUT J., MARION J. P., MUGGLER-CHAVAN F., REYMOND D., EGLI R. H., 1969. Sur la composition de l'arôme de la tomate. *Helv. Chem. Acta*, **52**, 887-891.

WONG F. F., CARSON J. F., 1966. Isolation of S-methyl methionine sulfonium salt from fresh tomatoes. *J. Agr. Food Chem.*, **14**, 247-249.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (1), 97-113.

ANALYSES BIOMÉTRIQUES DE QUELQUES CARACTÉRISTIQUES VARIÉTALES DU FRAMBOISIER EN VUE DE LA MÉCANISATION DE LA RÉCOLTE

A. LATRASSE et B. GAUTIER*

avec la collaboration technique de Mme Françoise MAGNON et Y. MONTOIR*

Station de Technologie des Produits végétaux, I. N. R. A.,
7, Rue Sully,
21034 Dijon Cedex

* *Compagnie nationale d'Aménagement de la Région*
du Bas-Rhône et du Languedoc (C. N. A. R. B. R. L.)
30000 Nimes

RÉSUMÉ

Trois caractéristiques variétales ont été étudiées en vue de la récolte mécanique de la framboise :

— la facilité de détachement des fruits exprimée par la force de fixation des framboises à leurs réceptacles ;
— la teneur en matière sèche soluble des fruits exprimée en degrés Brix ;
— la fermeté des framboises appréciée par le test de chute, test non destructif qui indique la résistance des fruits à l'écrasement.

Les mesures des forces de fixation présentent des dispersions variables autour de 1 ou 2 modes. Les variétés sont ordonnées suivant la facilité de détachement à partir des courbes de fréquences cumulées et relatives de ces forces. On repère sur ces courbes la valeur graphique F_{80} qui, pour une variété donnée, représente la force suffisante pour détacher 80 p. 100 des framboises mûres.

Il ressort de cette étude que les variétés à petits fruits dont la cueillette manuelle est la plus onéreuse (*Washington, Rose de Plombières, Capitou, Heytor, Canby*) sont particulièrement justiciables de la récolte mécanique en raison de la faible adhérence de leurs fruits. Cette facilité de détachement constitue un critère d'aptitude essentiel.

Parmi ces variétés, *Washington* présente trois qualités remarquables :

— une productivité élevée,
— la plus grande facilité de détachement des fruits,
— une teneur en matière sèche soluble des plus élevées, ce qui constitue un caractère favorable à l'utilisation industrielle.

La culture de cette variété serait donc à promouvoir en vue de la mécanisation de la récolte.

La récolte mécanique des variétés telles que *Puyallup*, dont les fruits sont les plus fermes et les plus savoureux, peut être envisagée. Celle des variétés productives à gros fruits comme les *Malling* et *Jochem Roem* doit être expérimentée par passage de machine.

Mots clés : *framboise, mécanisation de la récolte, caractéristiques variétales.*

INTRODUCTION

La mécanisation de la cueillette des petits fruits rouges, Cassis et Framboise notamment, est considérée comme un moyen d'accélérer la récolte, de traiter de grandes surfaces et d'abaisser le prix de revient à la production, en économisant de la main-d'œuvre. En 1967, la C.O.F.R.E.D.A. publiait une enquête dans laquelle le poste « cueillette manuelle » représentait 37 p. 100 du coût à la production. Cette proportion s'est accrue de nos jours par suite de l'augmentation du coût de la main-d'œuvre.

La cueillette manuelle des petits fruits est une tâche fastidieuse effectuée par une main-d'œuvre saisonnière, des jeunes en particulier. La rémunération est modeste et le recrutement souvent problématique. Ajoutons à cela que la notion de qualité des petits fruits est encore peu prise en compte dans l'établissement du prix d'achat à la production. L'importance des importations en provenance des pays de l'Est : Pologne, Yougoslavie, Roumanie est un facteur de pression sur les prix Dans ce contexte, la mécanisation de la récolte peut constituer un élément de relance de ces cultures. Il faut noter cependant que les structures actuelles des plantations ne sont pas adaptées à ce genre de récolte.

La récolte mécanique du Cassis peut être considérée comme étant au point. Divers procédés donnent satisfaction. Celle de la Framboise, par contre, est encore à l'étude. Un programme a été entrepris grâce à une aide financière accordée par la Délégation générale à la Recherche scientifique et technique. Il comprend :

— la réalisation d'un prototype de récolteuse à mettre au point par le Centre national d'Étude et d'Expérimentation du Machinisme agricole (C.N.E.E.M.A.) ;

— le choix de conduites culturales adaptées à la récolte mécanique, sous la responsabilité de la Compagnie nationale d'Aménagement de la Région du Bas-Rhône Languedoc (C.N.A.R.B.R.L.) ;

— la détermination des aptitudes variétales à la récolte mécanique par analyses biométriques de caractéristiques effectuées dans les collections de la C.N.A.R.B.R.L. et de la Station de Technologie des Produits végétaux de Dijon.

La suite de l'exposé porte sur la méthodologie et les résultats de ces analyses.

Nyborg et Coulthard ont publié en 1969 une étude sur les paramètres dont il faut tenir compte dans la réalisation d'une récolteuse mécanique. Ces auteurs ont mesuré plusieurs caractéristiques d'aptitude de la variété *Willamette* parmi lesquelles nous en avons retenu quelques-unes qui nous ont paru importantes : le calibre des fruits, les forces de fixation des framboises aux réceptacles, la teneur en matière sèche soluble et la résistance des fruits à l'écrasement.

Les caractères génétiques, agronomiques et technologiques des variétés étudiées ont été précisées dans des études précédentes (Duclos, Dupuy, Lantin, 1971 ; Duclos, Latrasse, 1971 ; Latrasse, Magnon, Demaizières, 1972).

La variété modèle, bien adaptée à la récolte mécanique, doit présenter essentiellement les caractéristiques suivantes :

— une productivité élevée,
— une maturation aussi groupée que possible pour limiter le nombre de passages de la machine,
— une force de fixation élevée des fruits verts qui ne doivent pas tomber au cours du battage,
— un détachement facile des fruits mûrs,
— une relative résistance de la végétation aux dommages mécaniques pour préserver les récoltes restant à faire et peut-être aussi pour prévenir les accidents d'origine phytosanitaire pouvant apparaître sur les tiges abîmées.

La présente étude est limitée à la mesure de trois caractéristiques physiques :

— la force de fixation, la résistance à l'écrasement et le calibre des fruits,

et à une caractéristique de composition :

— la teneur en matière sèche soluble, qui constitue un critère de qualité industrielle.

I. — PARTIE EXPÉRIMENTALE, MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — *Collections expérimentales*

Les mesures et observations ont été réalisées dans deux collections, l'une appartenant à la C.N.A.R.B.R.L. (Mas d'Asport situé sur la commune de Saint-Gilles dans le Gard) et l'autre appartenant à la Station de Technologie des Produits végétaux de l'I.N.R.A. à Dijon (framboiseraie du Domaine d'Époisses).

Les framboises mûres sont cueillies tous les 2 ou 3 jours. La coloration est considérée comme un critère de maturité par le cueilleur.

2. — *Force de fixation de la framboise à son réceptacle*

Les mesures de la force de fixation sont effectuées sur un échantillon de 50 à 80 framboises non équeutées, en utilisant un pèse-lettres comme dynamomètre (fig. 1). La force de fixation est égale à la force de traction provoquant le détachement de la framboise de son réceptacle. La mesure, donnée à 5 g près, s'effectue en exerçant une traction lente et régulière.

2. 1. *Courbes de fréquences cumulées et relatives des forces de fixation.*

Suivant les variétés, les dates de cueillette et l'état de turgescence des framboises, on observe des distributions de forces de fixation F présentant des dispersions variables autour de 1 ou 2 modes. La présence d'un deuxième mode indique certainement l'hétérogénéité de l'échantillon, malgré les précautions prises lors des prélèvements.

Pour la compréhension des résultats obtenus, il nous a paru utile de présenter en détail les déterminations statistiques effectuées à l'aide d'exemples caractéristiques sur 2 variétés : *Malling Enterprise* et *Canby*.

Les distributions ont été segmentées en classes de 16 g d'amplitude dont on a compté :

— les fréquences absolues : n_a
— les fréquences cumulées : n_c
— les fréquences cumulées en valeurs relatives, exprimées en p. 100 : $n_{c,r}$. Cette valeur correspond au rapport de la fréquence cumulée, pour une force de fixation donnée, par le nombre total des mesures effectuées.

Pour la suite des calculs, nous utiliserons les paramètres suivants :

x_i égal au rapport : $\dfrac{\text{quantité de fruits récoltés à une date } i}{\text{quantité totale de fruits récoltés dans la saison}}$

N_i, valeur pondérée de $n_{c,r}$ par x_i, soit :

$$N_i = n_{c,r} \times x_i$$

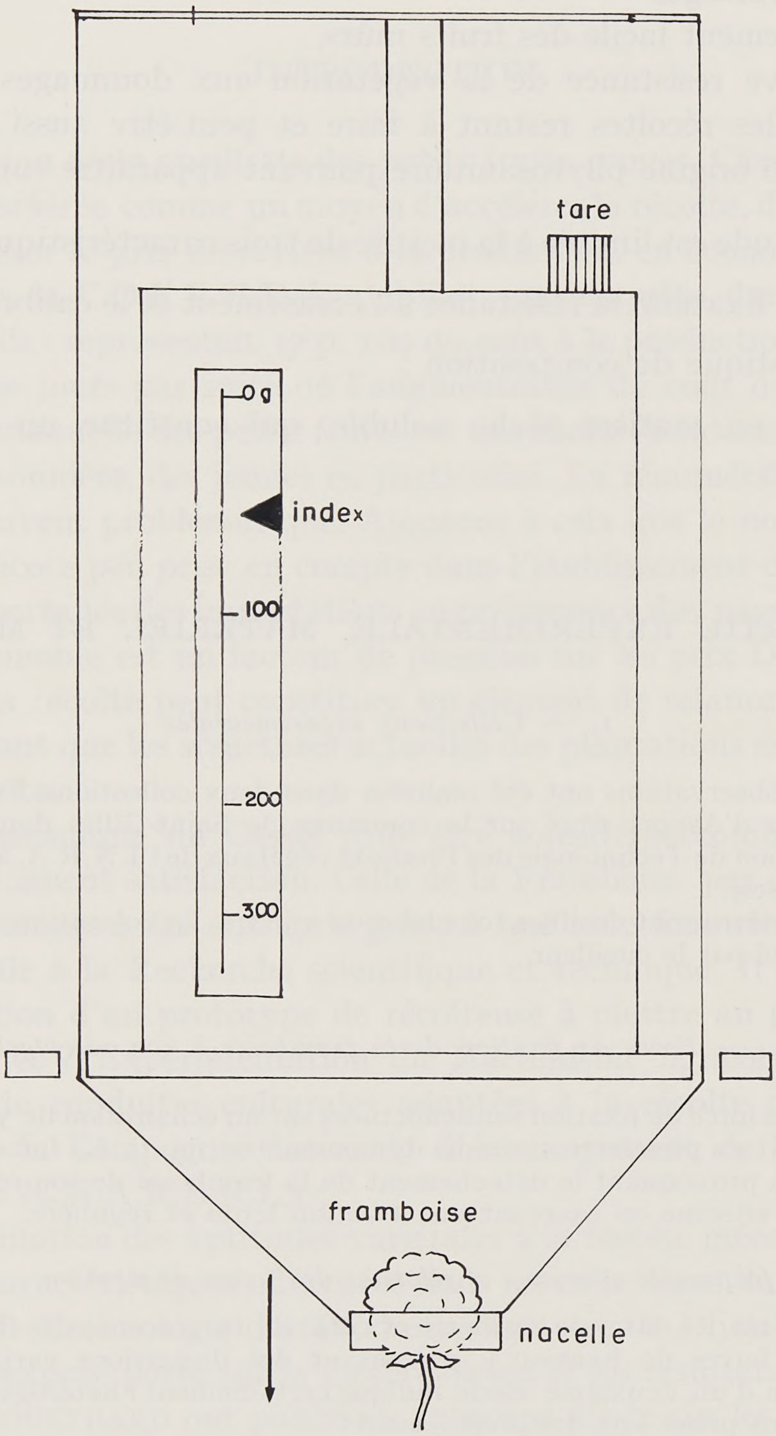


FIG. 1. — *Type de pèse-lettres utilisé comme dynamomètre pour mesurer les forces de fixation des framboises à leurs réceptacles*

a) *Malling Enterprise.*

La distribution des forces de fixation F est donnée, à titre d'exemple, dans le tableau 1 pour la cueillette du 4 juillet. Les classes de F sont repérées par leur centre. Cette variété a été cueillie à 5 reprises, les 4, 9, 11, 13 et 17 juillet 1973. La représentation graphique des variations de $n_{c,r}$ est constituée par un faisceau de 5 courbes (fig. 2). Pour interpréter ces mesures, nous avons

TABLEAU I

Exemples de distribution des forces de fixation des fruits des variétés
Malling Enterprise *et* Canby

Date	F g	8	24	40	56	72	88	104	120	136	152	168	184	200	216	232	248	264	280	296	312	328
Variété *Malling Enterprise*																						
4/7	n_a	9	7	9	5	10	3	3	3	4	4	4	0	2	0	1	0	0	1			
	n_c	9	16	25	30	40	43	46	49	53	58	59	59	61	61	61	62	62	63			
	$n_{c,r}$	14	25	39	47	63	68	73	77	84	92	93	93	96	96	98	98	98	100			
	x_i	10,7 p. 100																				
	N_i	1,5	2,6	4,2	5,0	6,7	7,3	7,8	8,2	9,0	9,8	9,9	9,9	10,2	10,2	10,5	10,5	10,5	10,7			
Variété *Canby*																						
9/7	n_a	29	9	12	4	4																
	n_c	29	38	50	54	58																
	$n_{c,r}$	50	65	86	93	100																
	x_i	40,1 p. 100																				
	N_i	20	26	34	37	40																

réduit ces 5 courbes en une seule, appelée « courbe de résolution expérimentale ». Cette dernière est représentative de la somme des N_i pour chaque classe de F (fig. 3). Remarquons que les mesures de F ont été faites à chaque cueillette. Nous repérerons sur la courbe de résolution expérimentale la valeur de F correspondant au détachement de 80 p. 100 des framboises mûres. Cette valeur que nous notons F_{80} servira à ordonner les variétés suivant la facilité de détachement de leurs fruits. Pour cet exemple, F_{80} est égal à 155 g.

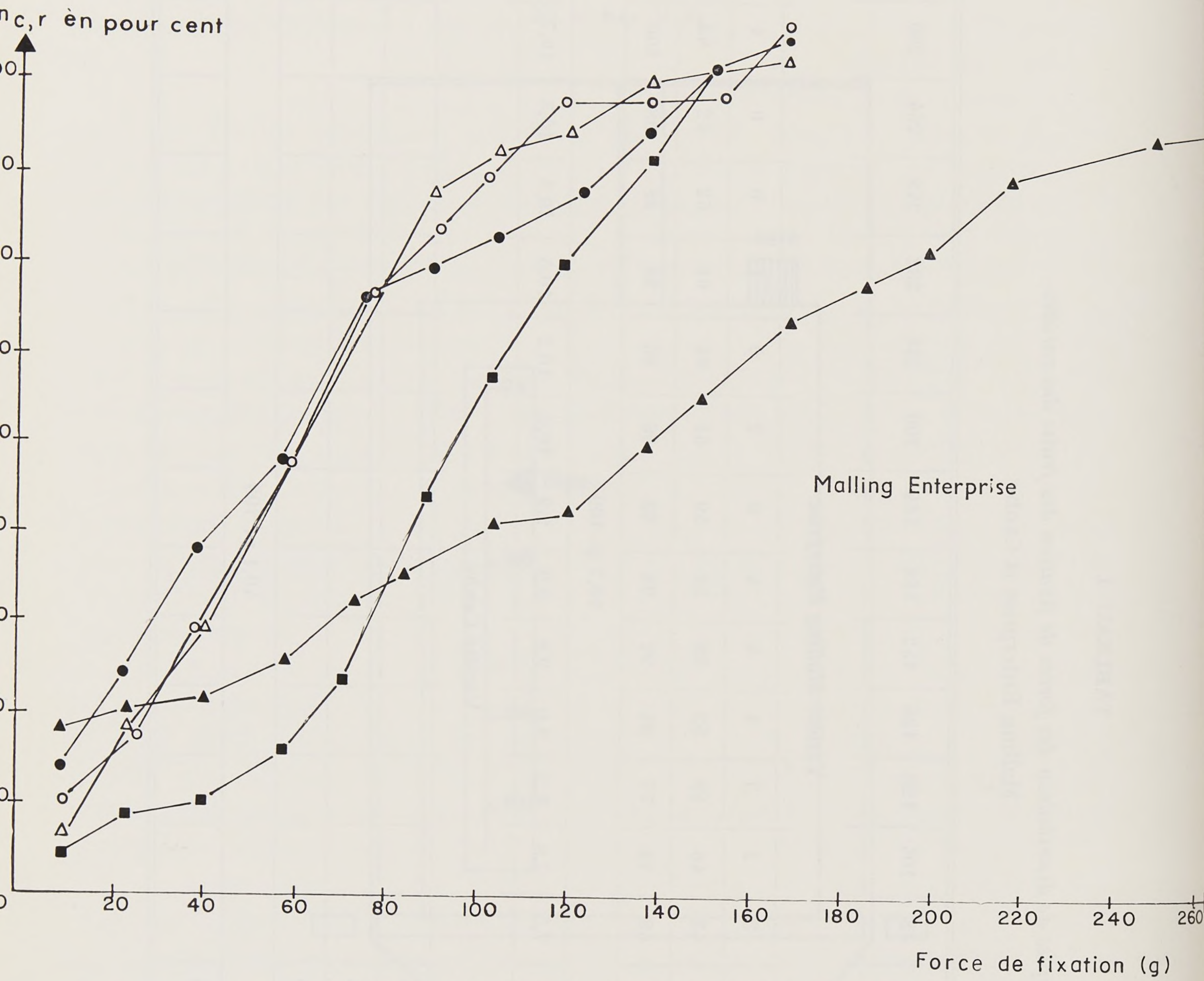


Fig. 2. — *Exemples de courbes de fréquences cumulées et relatives des forces de fixation des fruits de* Malling Enterprise (Dijon, expérimentation 1973), le 4-7 ; le 9-7 ; le 11-7 ; le 13-7 ; le 17-7

b) *Canby*.

Les mesures de F (exemple dans le tabl. 1) ont été faites aussi à chaque cueillette et durant toute la période de production. Nous repérons sur la courbe de résolution expérimentale (fig. 3) la valeur de F_{80} soit 32 g. La figure 3 montre les différences qui peuvent exister entre une variété comme *Canby* dont les fruits se détachent facilement et une variété comme *Malling Enterprise* dont les fruits sont fermement fixés à leur réceptacle.

Remarque :

La validité du facteur de pondération x_i ne se vérifie que lorsque les cueillettes sont espacées de 2 à 4 jours. Si l'intervalle qui sépare deux cueillettes est trop grand, une fraction importante de la récolte sera surmûrie et une partie des fruits sera tombée à terre.

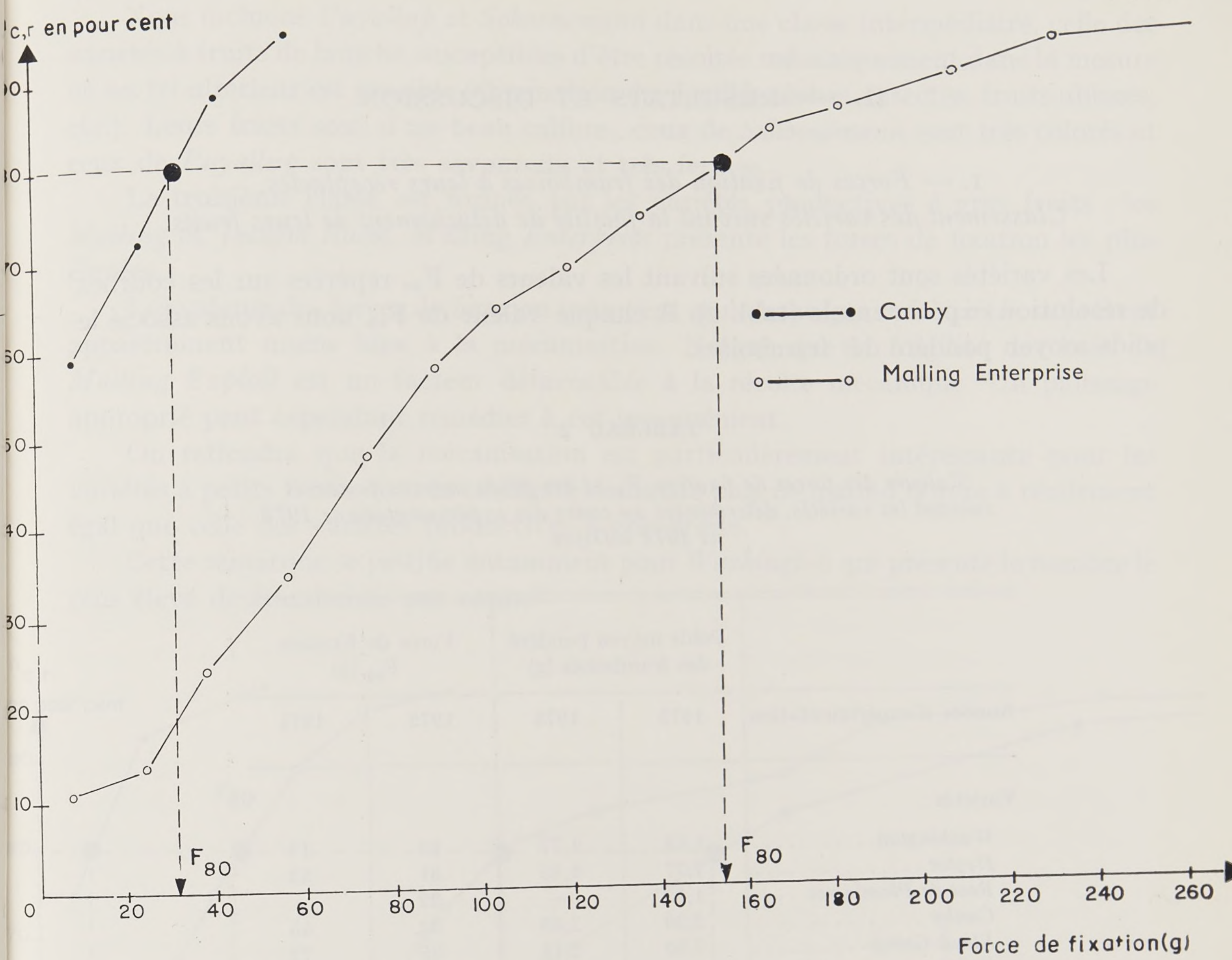


FIG. 3. — *Exemple de courbes de résolution expérimentale, comparaison entre une variété à fruits faiblement fixés* (Canby) *et une variété à fruits fortement fixés* (Malling Enterprise) (Dijon expérimentation 1973)

3. — *Matière sèche soluble des jus*

Le taux de matière sèche soluble a été apprécié à l'aide d'un réfractomètre à main.

Les mesures ont porté sur un jus moyen de cinq fruits et ont été répétées vingt fois lors de chaque date d'observation, pour chacune des variétés étudiées.

4. — *Résistance des fruits à l'écrasement*

Elle a été déterminée en faisant chuter des groupes de dix framboises mûres, d'une hauteur de 40 cm, sur du papier pelure, tendu sur une plaque de verre. Pour chaque variété, nous avons réalisé deux séries de 20 mesures. La résistance à l'écrasement est appréciée par le rapport du nombre d'impacts visibles sous forme de taches de jus divisé par le nombre total de fruits que l'on a fait tomber.

5. — *Poids moyen des fruits*

A chaque cueillette, le poids moyen $\overline{p}_i$, d'une framboise a été déterminé sur un échantillon de 30 fruits mûrs, prélevés au hasard. L'ensemble de la récolte a été utilisé pour calculer une moyenne pondérée égale à la somme des produits $\overline{p}_i \times x_i$.

II. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. — *Forces de fixation des framboises à leurs réceptacles.* *Classement des variétés suivant la facilité de détachement de leurs fruits*

Les variétés sont ordonnées suivant les valeurs de F_{80} repérées sur les courbes de résolution expérimentale (tabl. 2). A chaque valeur de F_{80} nous avons associé le poids moyen pondéré des framboises.

TABLEAU 2

Valeurs des forces de fixation F_{80} et des poids moyens pondérés suivant les variétés, déterminées au cours des expérimentations 1973 et 1974 à Dijon

	Poids moyen pondéré des framboises (g)		Force de fixation F_{80} (g)	
Années d'expérimentation	1973	1974	1973	1974
Variétés :				
Washington	1,68	1,77	13	19
Heytor	1,77	1,85	31	43
Rose de Plombières	1,63	—	32	
Canby	2,30	2,38	32	45
Lloyd George	2,30	2,18	35	72
Capitou	2,45	2,10	45	55
Puyallup	2,80	2,92	54	60
Schoenemann	3,26	2,68	59	63
Malling Jewel	2,60	2,76	65	112
Malling Exploit	3,60	3,39	90	110
Norfolk Giant	2,60	2,19	102	152
Jochem Roem	3,40	3,09	118	125
Malling Promise	3,06	3,02	140	120
Malling Enterprise	2,66	3,37	155	173

Les résultats obtenus en 1973 et en 1974 sont cohérents et les classements définis pour ces deux années sont pratiquement identiques. On remarquera que les valeurs de F_{80} obtenues en 1974 sont systématiquement supérieures à celles obtenues en 1973, ce qui peut être dû à un effet climatique, les mois de juin et juillet ayant été plus secs en 1973 qu'en 1974.

Le tableau 2 montre que les variétés à petits fruits *Washington, Heytor, Rose de Plombières, Canby, Capitou,* présentent les forces de fixation les plus faibles. Cette caractéristique est, comme on peut l'observer, liée à la petitesse relative des cônes de calice.

Parmi les variétés à petits fruits, *Norfolk Giant* fait exception, ses fruits sont fermement attachés aux réceptacles par un cône très hérissé.

Nous incluons *Puyallup* et *Schoenemann* dans une classe intermédiaire, celle des variétés à fruits de bouche susceptibles d'être récoltés mécaniquement dans la mesure où un tri ultérieur est possible (élimination des feuilles sèches, insectes, fruits abîmés, etc.). Leurs fruits sont d'un beau calibre ; ceux de *Schoenemann* sont très colorés et ceux de *Puyallup* sont très savoureux et très fermes.

La troisième classe est formée par les variétés productives à gros fruits : les *Malling* et *Jochem Roem*. *Malling Enterprise* présente les forces de fixation les plus élevées.

Les valeurs des forces de fixation indiquent seulement que ces variétés se prêtent apparemment moins bien à la mécanisation. Notons que la fragilité des bois de *Malling Exploit* est un facteur défavorable à la récolte mécanique. Un palissage approprié peut cependant remédier à cet inconvénient.

On retiendra que la mécanisation est particulièrement intéressante pour les variétés à petits fruits dont la cueillette demande plus de main-d'œuvre à rendement égal que celle des variétés productives à gros fruits.

Cette remarque se justifie notamment pour *Washington* qui présente le nombre le plus élevé de framboises par canne.

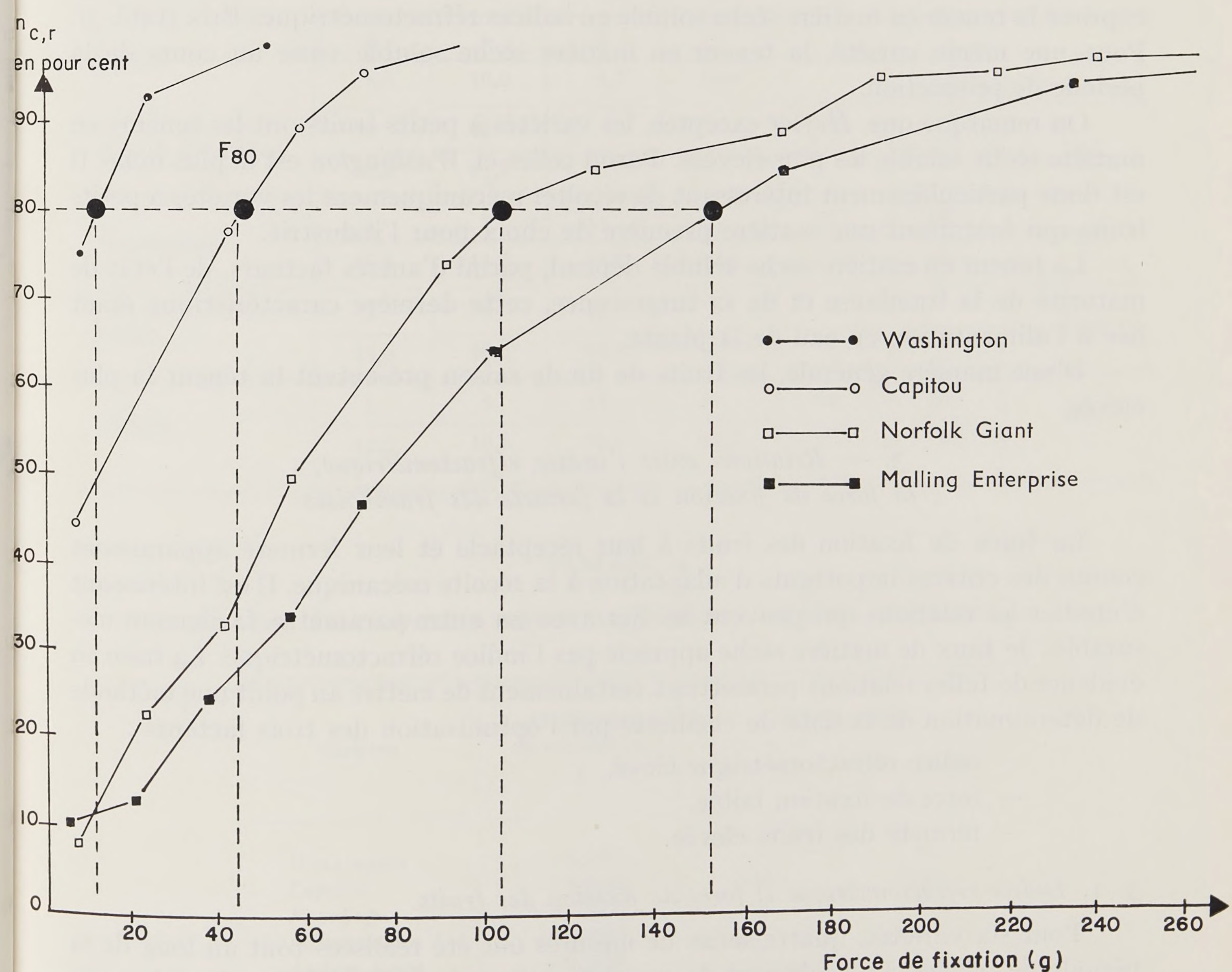


Fig. 4. — *Éventail caractéristique de courbes de fréquences pour des variétés à fruits faiblement fixés :* Washington, Capitou *et pour des variétés à fruits fermement fixés :* Norfolk Giant, Malling Enterprise. Repérage des F_{80}.

Remarques :

a) Nous avons rangé les variétés suivant les valeurs de F_{80} ; ce classement s'obtient également par voie graphique en rapprochant les courbes de fréquences cumulées et relatives des forces de fixation pour les variétés considérées. Un exemple d'une telle représentation est donné dans la figure 4.

b) Nous avons noté une influence de l'alimentation en eau du végétal sur la force de fixation des fruits à leurs réceptacles. Une augmentation de la turgescence des cellules correspond à une force de fixation élevée ; il serait intéressant de préciser ce phénomène en liaison avec la date des précipitations ou des arrosages et celle de la cueillette mécanique.

2. — *Matière sèche soluble des jus de framboise*

La matière sèche soluble est constituée par des sucres (45 à 80 g par kg de poids frais), glucose, fructose et quelquefois saccharose, des acides organiques libres et salifiés parmi lesquels l'acide citrique est le plus abondant (14 à 20 g par kg de poids frais), des pectines solubles (2,5 g par kg exprimé en acide galacturonique), des anthocyanes (dérivés du cyanidol et divers éléments minéraux solubles. Nous avons exprimé la teneur en matière sèche soluble en indices réfractométriques Brix (tabl. 3). Pour une même variété, la teneur en matière sèche soluble varie au cours de la période de production.

On remarque que, *Heytor* exceptée, les variétés à petits fruits ont les teneurs en matière sèche soluble les plus élevées. Parmi celles-ci, *Washington* est la plus riche. Il est donc particulièrement intéressant de récolter mécaniquement les variétés à petits fruits qui fourniront une matière première de choix pour l'industrie.

La teneur en matière sèche soluble dépend, parmi d'autres facteurs, de l'état de maturité de la framboise et de sa turgescence, cette dernière caractéristique étant liée à l'alimentation en eau de la plante.

D'une manière générale, les fruits de fin de saison présentent la teneur la plus élevée.

3. — *Relations entre l'indice réfractométrique, la force de fixation et la fermeté des framboises*

La force de fixation des fruits à leur réceptacle et leur fermeté apparaissent comme des critères importants d'adaptation à la récolte mécanique. Il est intéressant d'étudier les relations qui peuvent les lier avec un autre paramètre, facilement mesurable : le taux de matière sèche apprécié par l'indice réfractométrique. La mise en évidence de telles relations permettrait certainement de mettre au point une méthode de détermination de la date de cueillette par l'optimisation des trois facteurs :

— indice réfractométrique élevé,
— force de fixation faible,
— fermeté des fruits élevée.

3. 1. *Indice réfractométrique et force de fixation des fruits.*

Pour six variétés, quatre séries de mesures ont été réalisées tout au long de la période de récolte. Le coefficient de corrélation liant les deux critères étudiés a été calculé sur la totalité des mesures, soit sur 80 couples de valeurs (tabl. 4).

TABLEAU 3

Variations des teneurs en matière sèche soluble des framboises suivant les variétés

Variétés		Dates de cueillette (juillet)* / Matière sèche soluble* p. 100						Moyenne arithmétique
Norfolk Giant	*	11	13	16	20			11,3
	*	12,5	12,8	10,6	9,5			
Puyallup		4	7	9	11	17		11,2
		12,4	9,8	10,0	11,0	12,9		
Jochem Roem		4	8	10	11	13	20	9,4
		9,1	8,6	8,1	9,8	10,2	10,5	
Schoenemann		5	10	13	16	20		10,2
		11,0	10,1	10,0	10,0	10,2		
Lloyd George		3	9	11	13			10,4
		9,5	10,5	11,2	10,8			
Heytor		3	5	9	11			9,4
		8,0	10,0	8,7	10,9			
Rose de Plombières		10	18					12,2
		12,6	11,9					
Washington		4	9	11	13	16	20	12,7
		15,1	11,7	11,8	12,6	12,8	12,3	
Canby		7	9	13				11,8
		11,3	10,3	13,8				
Capitou		5	9	11	13	16	20	10,5
		12,2	10,8	10,0	10,2	10,7	9,6	

TABLEAU 4

Recherche d'une corrélation entre la force de fixation et l'indice réfractométrique

Variétés	Coefficient de corrélation r	Signification $\alpha = 0,1$	Signification $\alpha = 0,05$
Washington	— 0,4965	S	S
Capitou	— 0,0437	NSD	NSD
Puyallup	— 0,4071	S	S
Schoenemann	— 0,2317	S	S
Jochem Roem	— 0,3476	S	S
Lloyd George	— 0,1016	NSD	NSD

Nous admettrons comme réalisées les conditions préalables à l'emploi de la corrélation :

— Normalité de distribution des x et des y,
— Linéarité de la régression des x en y et des y en x.

Le coefficient de corrélation indique le type et l'intensité de la liaison entre le x et les y c'est-à-dire ici entre la force de fixation et l'indice réfractométrique.

Dans le tableau 4 des coefficients de corrélation, on constate que pour l'ensemble des mesures toutes les valeurs sont négatives. Cela semble donc indiquer que force de fixation et indice réfractométrique varient en sens inverse.

En l'occurrence, lorsque l'indice réfractométrique est élevé, la force de fixation des fruits est faible.

Il devient alors tentant de tracer la droite de régression de la forme $y = ax + b$ à partir de laquelle il pourrait être aisé de déterminer une date de récolte.

Cependant, lorsqu'on examine l'ensemble du tableau, on constate que les valeurs des coefficients de corrélation, notamment par semaine, sont faibles. Mathématiquement, on démontre que r^2 multiplié par 100 indique le pourcentage de la variation totale qui est due à la dépendance de y en x. Or, ici il est très faible, souvent inférieur à 10 p. 100.

Nous avons alors calculé la signification de r par rapport à $\rho = 0$, car, compte tenu de la fluctuation d'échantillonnage, il s'agit de savoir si le r calculé sur l'échantillon est significativement différent de la corrélation nulle dans une population théoriquement infinie.

Nous constatons alors que presque toutes les valeurs de r ne sont pas significativement différentes de 0, sauf pour l'ensemble des mesures où, pour 4 variétés sur six, les valeurs de r sont significativement non nulles.

Il convient alors de modifier profondément l'affirmation avancée plus haut. Les droites de régression qui ne peuvent être tracées que pour quatre variétés doivent être utilisées avec précaution. Même pour deux variétés, *Jochem Roem et Schoenemann*, il est préférable de ne pas tracer de droite de régression, à cause de la faible valeur de r (bien qu'elle soit significative).

Nous avons alors tracé les droites de régression pour les variétés *Washington* et *Puyallup*. Les équations de ces droites sont les suivantes :

Washington :

$$y = -0{,}0201\,x + 14{,}1889$$

Puyallup :

$$y = -0{,}039\,x + 13{,}4850$$

Nous accepterons comme réalisées les deux conditions suivantes :

— Linéarité de la régression,
— Coefficient de régression significativement non nul.

En raison de la faible pente de ces droites, il n'est pas prudent de leur accorder une trop grande confiance. On ne peut pas se baser sur des résultats si faiblement significatifs pour déterminer une date de cueillette.

3. 2. *Indice réfractométrique et résistance des fruits à l'écrasement.*

Pour chaque série de mesures et pour chaque variété, nous disposons de 20 couples de 10 fruits sur lesquels a été mesuré l'indice réfractométrique et effectué un test de chute.

Interprétation.

Nous avons calculé un coefficient de corrélation pour chaque variété sur chacune des séries de mesure et pour l'ensemble des mesures (tabl. 5).

TABLEAU 5

Recherche d'une corrélation entre l'indice réfractométrique et la résistance des fruits à l'écrasement

Variétés	Coefficient de corrélation r	Signification $\alpha = 0,1$	$\alpha = 0,05$
Washington	0,1151	NSD	NSD
Capitou	0,0010	NSD	NSD
Puyallup	— 0,4837	S	S
Schoenemann	0,6462	S	S
Jochem Roem	0,2299	NSD	NSD
Lloyd George	— 0,2654	NSD	NSD

Nous admettons comme réalisées les deux conditions préalables à l'emploi de la corrélation déjà citée.

Nous constatons que les coefficients de corrélation calculés sont de signe positif (sauf pour *Puyallup*). C'est donc que la valeur de l'indice réfractométrique et celle du test de chute varient dans le même sens .

Ce résultat apparaît comme logique : plus un fruit est mûr, plus il sera sensible à la chute et plus son indice réfractométrique sera élevé. L'inverse est vrai aussi.

Cependant, nous constatons que, comme pour les forces de fixation, toutes les valeurs sont proches de zéro. D'ailleurs — après calcul — pour l'ensemble des mesures, deux coefficients seulement sont significativement différents de zéro (pour *Puyallup* et *Schoenemann*).

Nous avons également, pour ces deux variétés, tracé les droites de régression d'équation ;

Schoenemann :

$$y = 0{,}2237\, x + 8{,}1318$$

Puyallup :

$$y = -\,0{,}3099\, x + 13{,}5425$$

Cependant, il nous semble imprudent, à cause, d'une part, de la si faible signification des résultats et, d'autre part, de leur contradiction, de se fier à des droites pour déterminer une date de cueillette.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Aptitudes variétales.

L'analyse des résultats précédents permet de classer les variétés étudiées en trois groupes selon leur destination :

1 — *Variétés à petits fruits à débouché industriel*

Leurs fruits se détachent facilement. Ce caractère est d'importance puisqu'il permet d'envisager une cueillette suffisamment douce, ménageant la végétation. Certaines de ces variétés, comme *Rose de Plombières* et *Capitou*, cultivées respectivement en Bourgogne et dans le Midi de la France, récoltées actuellement à la main, devraient se prêter à la récolte mécanique. Signalons que leurs bois érigés constituent un facteur favorable supplémentaire.

Les fruits de ces variétés, *Heytor* exceptée, conviennent particulièrement à l'industrie en raison de la teneur élevée de leur jus en matière sèche soluble.

Parmi elles, *Washington* nous paraît la seule qui possède à la fois trois caractères remarquables :

— sa productivité est la plus élevée parmi les variétés à petits fruits étudiées ;
— ses fruits se détachent avec la plus grande facilité ;
— la teneur en matière sèche soluble de ses fruits est élevée.

2. — *Variétés à fruits de bouche destinées au marché de frais*

Nous incluons dans ce groupe *Puyallup* dont les fruits sont fermes et savoureux et *Schoenemann*, productive, dont les fruits colorés sont d'un beau calibre.

Les fruits de *Puyallup* se détachent facilement. Toutefois cette variété n'est à implanter que dans des zones où l'on peut lui assurer une alimentation en eau sans défaillance : sa production diminue en effet en milieu sec après 5 ou 6 années de culture.

3. — *Variétés productives à gros fruits*

Leurs fruits sont fermement fixés aux réceptacles. Les autres critères de qualité étant satisfaisants par ailleurs, leur aptitude à la récolte mécanique sera déterminée par les performances de la machine de récolte. La variété *Malling Enterprise* représente bien ce groupe variétal.

Remarque concernant l'influence de la force de fixation des fruits sur la qualité du produit d'une récolte de type mécanique :

La seule considération de la valeur de F_{80} ne décide pas catégoriquement de l'aptitude d'une variété considérée à la récolte mécanique. Seulement, nous avons pu observer, à l'occasion d'essais qui devront être répetés, que l'intensité de la force de fixation conditionnait dans une certaine mesure la qualité du produit de la récolte mécanique. *Washington* et *Malling Enterprise*, variétés opposées par leurs valeurs de F_{80}, ont été palissées suivant un support en forme de Y. On fait tomber les fruits

mûrs en frappant modérément les fils du palissage avec un bâton en guise de batteur. Avec *Washington*, on ne récolte que des baies mûres, équeutées. La récolte de *Malling Enterprise* par contre comprend un pourcentage visuellement élevé de baies attachées à leurs réceptacles et à leurs pédoncules qui nécessitent un tri.

Pour les variétés dont les fruits sont fermement attachés à leurs réceptacles, la qualité du produit de la récolte mécanique sera donc moins bonne que celle des variétés dont les fruits se détachent aisément.

4. — *Détermination d'une date optimale de cueillette*

Des relations entre l'indice réfractométrique, la fermeté des fruits et leur force de fixation ont été mises en évidence pour un certain nombre de variétés. Toutefois ces relations paraissent trop lâches pour que l'on puisse proposer une méthode sûre de détermination de la date de cueillette.

Il est probable qu'il sera nécessaire de prendre en compte de nombreux paramètres, dont les données climatiques particulières à chaque années, ainsi que des caractéristiques phénologiques qui restent à déterminer.

Les résultats exposés précédemment ont été obtenus au cours de deux campagnes d'observations (1973 et 1974) et en deux stations différentes (Côte d'Or et Gard).

Reçu pour publication en décembre 1975.

Abréviations :

I.N.R.A. : Institut national de la Recherche agronomique.
C.N.A.R.B.R.L. : Compagnie nationale d'Aménagement de la Région du Bas-Rhône Languedoc.
C.O.F.R.E.D.A. : Compagnie pour favoriser la Recherche et l'Élargissement des Débouchés agricoles.
C.N.E.E.M.A. : Centre national d'Étude et d'Expérimentation du Machinisme agricole.

SUMMARY

BIOMETRY ANALYSES OF SOME VARIETAL CHARACTERISTICS OF RASPBERRY WITH A VIEW TO MECHANICAL HARVESTING

Three varietal characteristics have been studied with a view to raspberry mechanical harvesting :

- — the berry-detachment readiness expressed by the attachment strength of raspberries to their receptacles ;
- — the content in soluble dry matter of fruits expressed as Brix degrees ;
- — the raspberry firmness measured in the impact test, a non destructive test which indicates the fruit resistance to squashing.

The measures of the attachment strength present variable dispersions round one or two modes. The varieties are classified according to the berry-detachment readiness from the curves representing the cumulated and relative frequencies of this strength. The graphic value F_{80} on these curves indicates for a given variety the strength necessary to harvest 80 p. 100 of mature raspberries.

This study reveals that mechanical harvesting is particularly indicated for the small fruit varieties for which hand harvesting is the most expensive (*Washington, Rose de Plombières, Capitou, Heytor, Canby*) because of the bad adherence of their fruits. This detachment readiness is an essential criterion of aptitude.

Among these varieties, *Washington* presents three noteworthy characteristics :

- — a high productivity ;
- — the best detachment readiness ;
- — one of the highest contents in soluble dry matter which constitutes a criterion favourable to the industrial utilisation.

The culture of this variety should be promoted in view to mechanical harvesting.

The mechanical harvesting of varieties such as *Puyallup* with the firmest and the most savoury fruits can be faced. That of productive varieties with big fruits such as the *Malling* and *Jochem Roem* shall be tested by the use of a harvester.

RESUMEN

ANALISIS BIOMETRICOS DE ALGUNAS CARACTERISTICAS VARIETALES DEL FRANBUESO, CON MIRAS A LA MECANIZACTION DE LA COSECHA

Han sido sometidas a estudio tres características varietales con miras a la cosecha mecánica de la frambuesa, a saber :

— la facilidad de desprendimiento de los frutos, expresada por la fuerza de fijación de las frambuesas a sus receptáculos;
— el contenido en materia seca soluble de los frutos, expresada en grados Brix;
— la consistencia de las frambuesas, apreciada por el ensayo de caída, ensayo no destructivo que indica la resistencia de los frutos al aplastamiento.

Las medidas arrojadas por las fuerzas de fijación presentan dispersiones variables en torno a 1 ó 2 modos. Las variedades son ordenadas según la facilidad de desprendimiento a partir de las curvas de frecuencias acumuladas y relativas de estas fuerzas. Se localiza en estas curvas el valor gráfico F_{80} el cual, para una variedad determinada, representa la fuerza suficiente para desprender un 80 p. 100 de las frambuesas maduras.

De este estudio se deriva que las variedades de fruta de pequeñas dimensiones cuya recolección manual es sumanente costosa (*Washington, Rose de Plombières, Capitou, Heytor, Canby*) justifican particularmente la coseche mecanizada, debico a la reducida adherencia de sus frutos. Esta facilidad de desprendimiento constituye un criterio de aptitud primordial.

Entre estas variedades, *Washington* presenta tres cualidades dignas de mención :

— una productividae elevada;
— la major facilidad de desprendimiento de los frutos;
— un contenido en materia seca soluble sumamente elevado, lo cual constituye un carácter favorable para la utilización industrial.

Consecutivamente, parece interesante promover el cultivo de esta variedad, con miras a la mecanización de las cosechas.

La cosecha mecánica de las variedades como, por ejemplo, *Pullayup*, cuyos frutos son los más consistentes y más sabrosos, puede ser contemplada con interés. La cosecha mecánica de las variedades productivas de frutas de gran tamaño, como las *Malling* y *Jochem Roem*, deberá ser experimentada por paso por la máquina.

RIASSUNTO

ANALISI BIOMETRICHE DI ALCUNI ASPETTI CARATTERISTICI DELLE DIVERSE VARIETA DI LAMPONE IN VISTA DELLA RACCOLTA MEDIANTE MEZZI MECCANICI

In vista di una raccolta del lampone mediante mezzi meccanici, sono stati studiati tre elementi caratteristici secondo ogni varietà :

— la facilità di distacco del frutto espressa dalla forza di fissaggio dei lamponi ai loro ricettacoli ;
— il tenore di materia secca solubile del frutto espresso in gradi Brix ;
— la sodezza dei lamponi valutata mediante il test di caduta che è un test non distruttivo e che indica la resistenza del frutto allo schiacciamento.

Le misure delle forze di fissaggio presentano delle dispersioni variabili attorno a 1 e 2 modi. Le varietà sono classificate secondo la facilità di distacco a partire dalle curve di frequenza cumulate e relative di questa forze. Su questa curve, si indica il valore grafico F_{80} che, per una varietà data, rappresenta la forza sufficiente per staccare 80 p. 100 dei lamponi maturi.

Questo studio fa apparire che le varietà a frutto piccolo per le quali la raccolta manuale è la più onerosa (*Washington, Rose de Plombières, Capitou, Heytor, Canby*), giustificano in modo particolare la raccolta meccanica a causa della debole aderenza del loro frutto. Questa facilità di distacco costituisce un criterio d'attitudine essenziale.

Tra queste varietà, il tipo *Washington* possiede tre qualità importanti :

— una produttività elevata ;
— là più grande facilità di distacco del frutto ;
— un tenore di materia secca solubile tra i più elevati, il che costituisce un elemento importante per l'impiego su scala industriale.

La coltura di questa varietà dovrebbe essere dunque promossa in vista della raccolta meccanizzata.

La raccolta mecanizzata potrebbe essere prevista egualmente per la varietà *Puyallup* giacchè il frutto appartenente a questa specie è molto sodo e molto saporito. Per quanto riguarda infine le varietà del tipo *Malling* e *Jochem Roem* il cui frutto è alquanto grosso, è necessario effettuare degli esperimenti con la macchina prevista per la raccolta.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DUCLOS J., DUPUY P., LANTIN B., 1971. Étude agronomique et technologique de quelques variétés de Framboisier. *Ann. Amélior. Plantes*, **21** (3), 287-301.

DUCLOS J., LATRASSE A., 1971. Comparaison des produits fixes et volatils de variétés de framboises à divers stades de maturité. *Ann. Technol. Agric.*, **20** (2), 141-151.

LATRASSE A., MAGNON F., DEMAIZIÈRES D., 1972. Productivité et qualités de quelques variétés de framboises. *Symposium F.I.J.U.*, Dijon (France). Jus de fruits. Recherches Scientifiques et Technologiques, 62-83.

NYBORG E. O., COULTHARD T. L., 1969. Design parameters for mechanical raspberry harvesters. *Transactions of the ASAE*, **12** (5), 573-576.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (1), 115

CHRONIQUE DE LIVRES

RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD É., RIBEREAU-GAYON P., SUDRAUD P. — SCIENCES ET TECHNIQUES DU VIN (TRAITÉ D'ŒNOLOGIE). — Paris.

Le Traité d'Œnologie publié par J. RIBEREAU-GAYON et E. PEYNAUD en 1960 et 1961 a servi d'ouvrage de référence, de manuel scolaire et de guide à toute une génération d'œnologues. Les éditions qui ont été réalisées en langues étrangères indiquent l'importance que cet ouvrage a eu au niveau mondial.

Le nouvel ouvrage qui le remplace, *Science et Technique du Vin*, comportera quatre tomes et le nombre de pages sera porté de 1 000 à 2 500. Les deux premiers tomes, *Analyse et Contrôle des Vins* (1972) et *Caractère des Vins, Maturation du Raisin, Levures et Bactéries* (1974) constituent une introduction à l'art et à la technique de l'élaboration des vins. Le tome 3, *Vinifications, Transformations du Vin*, constitue le cœur du traité et était attendu avec impatience.

Dans cette partie qui aurait pu être seulement descriptive, les auteurs ont conservé la méthodologie scientifique qu'ils avaient déjà adoptée dans les chapitres plus fondamentaux de l'ouvrage. La description des diverses techniques de vinifications est précisée par de nombreuses données analytiques concernant les vins qui en sont issus.

Les auteurs ont fait toute leur carrière scientifique à l'Institut d'Œnologie de l'Université de Bordeaux II, ils sont habitués à travailler ensemble et ont rédigé cet ouvrage en commun, ce qui lui donne une grande unité. La contribution considérable qu'ils ont apporté à l'œnologie moderne ne leur a pas fait négliger les travaux d'autres équipes.

Ce livre sera utile aux étudiants en œnologie qui y trouveront clairement exposés les diverses techniques et leurs justifications. Les chercheurs seront surtout intéressés par les nombreux documents qu'il contient et des références bibliographiques nombreuses et récentes. Les praticiens vont enfin disposer d'un ouvrage moderne sur les différentes méthodes de vinifications. C'est la première fois d'ailleurs que certaines techniques comme la vinification en continu, la vinification par macération carbonique, la vinification avec chauffage de la vendange sont vraiment intégrées dans un traité d'œnologie.

Sommaire

VINIFICATIONS : Amélioration de la vendange. Transformations préfermentaires. Opérations communes aux différentes vinifications. Vinification en rouge. Vinification continue. Vinification avec macération carbonique. Vinification avec chauffage de la vendange. Vinification en blanc. Vinification en rosé. Vinifications spéciales.

TRANSFORMATIONS DU VIN : Les phénomènes colloïdaux dans les vins. Les précipitations dans les vins. Les phénomènes d'oxydation et de réduction dans les vins. Vieillissement des vins.

P. D.

Tome 3. Vinifications, transformations du vin.

annales de technologie agricole

Trimestriel

1976

Vol. 25 . N° 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (2), 117-124.

ACTION DES ULTRASONS SUR LA FERMENTATION ALCOOLIQUE DE LA MÉLASSE DE BETTERAVE PAR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Joëlle LE MAO et R. O. PRUDHOMME

Laboratoire de Biophysique des Ultrasons,
École pratique des Hautes-Études,

Laboratoire de Physico-Chimie par Ultrasons,
Université Pierre et Marie Curie,
28, rue du Dr Roux, 75015 Paris

RÉSUMÉ

L'influence des ultrasons sur la fermentation alcoolique par les levures est étudiée en fonction de la fréquence ultrasonore, de la puissance acoustique, du temps d'irradiation. La vitesse de production d'alcool est augmentée par un traitement à basse fréquence. Une inhibition de la fermentation est observée à haute fréquence.

Connaissant les effets des ultrasons en milieu liquide, nous avons voulu déterminer le rôle de ces derniers dans l'évolution de la fermentation. L'action cytolytique des ultrasons a permis d'interpréter les résultats obtenus à haute fréquence, mais à basse fréquence les différentes hypothèses envisagées n'ont pu expliquer l'augmentation de la vitesse de fermentation.

Mots clés : *ultra-sons, fermentation alcoolique,* Saccharomyces cerevisiae, *betterave, mélasse.*

I. — INTRODUCTION

L'action des ultrasons sur la fermentation alcoolique par les levures, et en particulier *Saccharomyces cerevisiae,* a fait l'objet d'un certain nombre de travaux.

EULER et SKARZINSKI (1934) ont montré qu'à haute fréquence ultrasonore (800 KHz) et puissance acoustique de 3 W/cm² la croissance et la fermentation des levures étaient inhibées, sans donner d'autres explications que la lésion des cellules. KATSELSON et KHENOKH (1951) ne précisent pas les effets sur la croissance, mais observent une augmentation de 12 p. 100 de la vitesse de fermentation par une irradiation des levures à 425 KHz (intensité non précisée). ANDERSON (1953) trouve qu'à fréquence élevée (1 MHz) et puissance acoustique de 10 W/cm² les vitesses de fermen-

tation et croissance sont notablement diminuées. L'inhibition de la fermentation est expliquée par la réduction de la population de levures. Cette dernière résulte de lésions et d'altérations des cellules dues aux ultrasons.

D'autre part, dans la fabrication de l'alcool de betterave, l'emploi des ultrasons semble donner une augmentation intéressante de la vitesse de la production d'alcool, surtout en début d'expérience (compte rendu des travaux U.N.G.D.A. (1), A.I.B.A. (2)).

Devant l'ensemble de ces travaux, on se propose d'étudier l'action des ultrasons à différentes fréquences et à basse puissance acoustique sur la fermentation de la mélasse de betterave par *Saccharomyces cerevisiae*.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Conditions expérimentales

1. *Fermentations.*

Les essais de fermentation sont effectués sur une solution de mélasse de betterave dans l'eau distillée (12,50 p. 100 en saccharose) ensemencée avec des levures de boulanger, *Saccharomyces cerevisiae* (levure pressée à 0,75 p. 100 poids/volume).

La fermentation est conduite à 33° ± 1°C. On assure la régulation de la température à l'aide d'un bain thermostatique et par l'emploi d'une cuve de fermentation en acier inoxydable.

2. *Ultrasons.*

Les traitements ultrasonores se font à deux fréquences différentes.

a) A basse fréquence, les ultrasons sont produits par un générateur de haute fréquence faisant vibrer un convertisseur à 20 KHz. Ce dernier est muni d'une sonde qui plonge directement dans la cuve contenant le milieu à fermenter (appareil Branson Sonifier B-12). La puissance acoustique varie dans nos expériences de 45 W acoustiques totaux, soit 1,9 W/cm², à 90 W acoustiques totaux, soit 3,9 W/cm².

b) A 800 KHz, les ultrasons sont produits par un « transducer » en titanate de baryum mis en vibration par un générateur de haute fréquence (appareil Luziesa). L'émission d'ultrasons se fait dans le bain thermostatique et le faisceau ultrasonore se propage verticalement dans l'eau. Il pénètre alors dans une cuve contenant le milieu à traiter. Le fond de la cuve est formé d'une membrane de nitrocellulose de 0,03 mm d'épaisseur transparente aux ultrasons et imperméable à l'eau (PRUDHOMME, 1954). La puissance acoustique utilisée est de 1,3 W/cm².

3. *Techniques analytiques.*

Des méthodes classiques sont utilisées pour suivre la fermentation alcoolique : teneur en éthanol (FLANZY *et al.*, 1955), numération des levures et taux de survie (FINK et KUHLES, 1933), dosage des sucres réducteurs (G. BERTRAND).

III. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. — *Étude de la production d'éthanol*

Cinétique.

L'allure générale de la production d'éthanol au cours des fermentations effectuées avec ou sans traitement ultrasonore est représentée dans la figure 1.

(1) Union nationale des Groupements de Distillateurs d'Alcool.
(2) Association interprofessionnelle des Producteurs de Betteraves et d'Alcool de Betteraves.

Facteurs influençant la production d'éthanol.

A) *Fréquence ultrasonore.*

L'examen des courbes de la figure 1 permet de constater :

a) A basse fréquence, soit 20 KHz, la vitesse de réaction est augmentée dès le début de la fermentation, mais la quantité maximale d'éthanol élaborée reste identique à celle du témoin.

b) A 800 KHz, haute fréquence, la fermentation est inhibée.

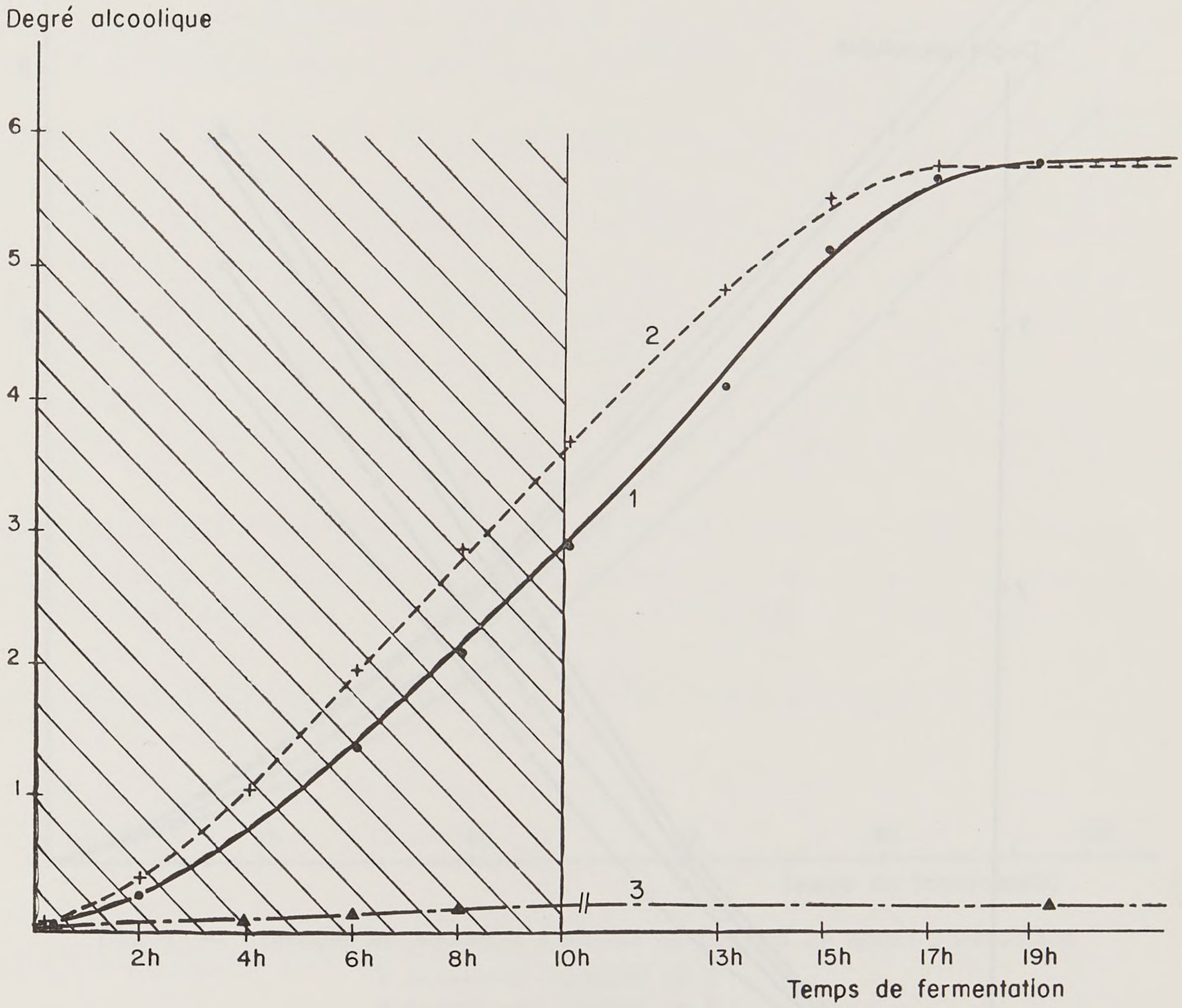


FIG. 1. — *Cinétique de formation d'éthanol en fonction de la fréquence ultrasonore*

1 : Témoin sans irradiation
2 : Irradiation à 20 KHz de 10 h
3 : Irradiation à 800 KHz de 10 h

B) *Puissance acoustique.*

L'influence de ce facteur sur la cinétique de formation d'éthanol (fig. 2) n'est étudiée qu'à basse fréquence ultrasonore puisque l'augmentation de la vitesse de réaction est observée dans ces conditions. D'autre part, on suit la production d'alcool pendant la première partie de la fermentation (10 h), le phénomène ayant lieu au cours de cet intervalle de temps.

Les moyennes puissances favorisent l'augmentation de la vitesse de fermentation.

C) *Temps d'irradiation.*

Dans nos essais, la production d'alcool croît avec le temps d'irradiation (courbes 1, 2, fig. 3) et se poursuit après l'arrêt de ceux-ci (courbe 3, fig. 3).

Le temps d'irradiation (4 h) semble être optimal pour l'observation du phénomène décrit et nous l'adopterons dans nos expériences ultérieures.

On peut conclure de ces différentes études que l'augmentation de la vitesse de formation d'éthanol :

1) requiert une irradiation à basse fréquence ultrasonore,
2) est favorisée par les moyennes puissances,
3) nécessite un temps d'ultrasonation court et correspondant au début de la fermentation.

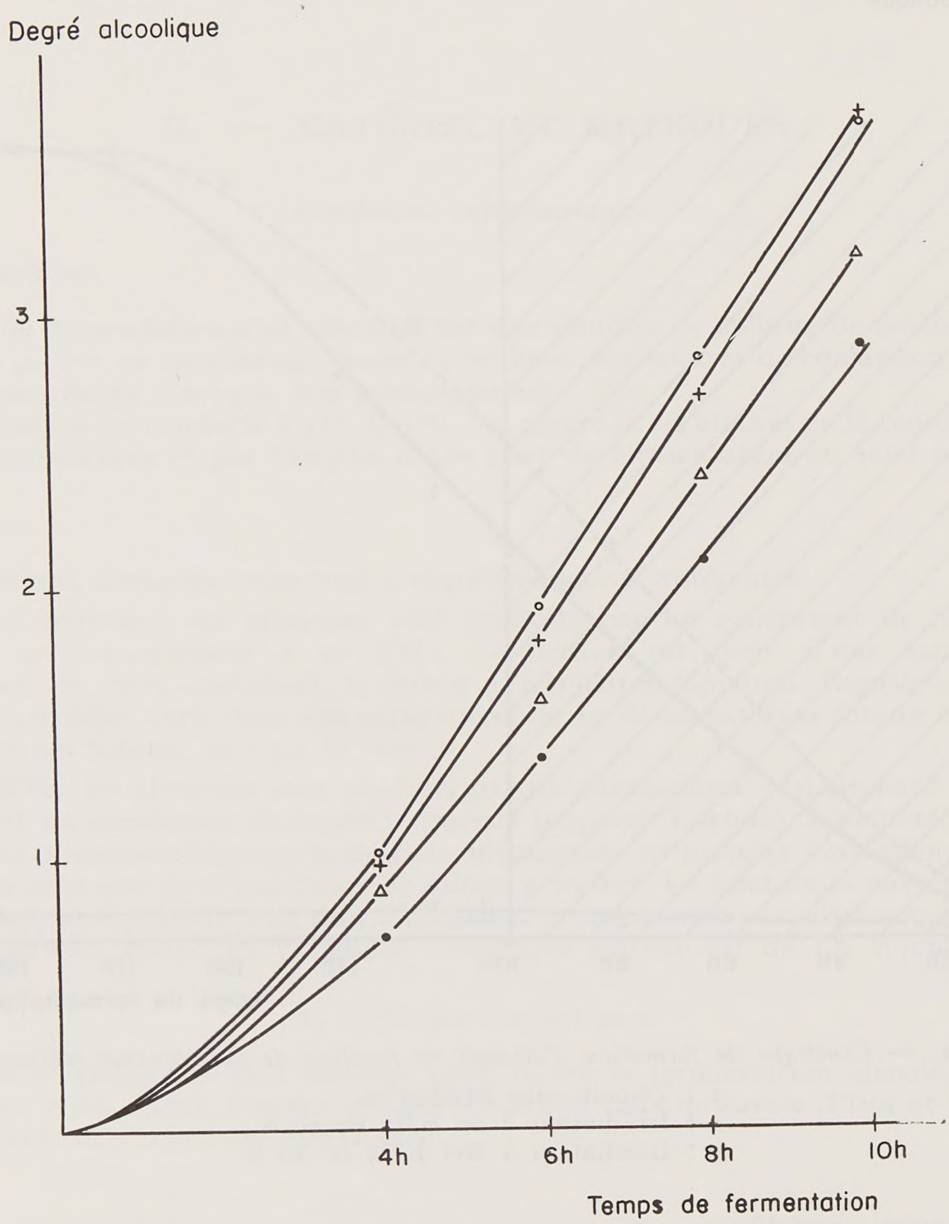


FIG. 2. — *Cinétique de formation d'éthanol en fonction de la puissance acoustique*

●———●	Témoin sans irradiation	
△———△	Irradié à 3,9 W/cm²	20 KHz
○———○	Irradié à 2,3 W/cm²	10 h
+———+	Irradié à 1,9 W/cm²	

2. — *Mode d'action des ultrasons*

Rappelons qu'en milieu liquide les ultrasons provoquent des mouvements vibratoires et, lorsque l'énergie acoustique est suffisante pour obtenir la cavitation gazeuse, des actions mécaniques (cytolyses et dépolymérisations) et des actions

chimiques, en général des oxydations (PRUDHOMME, 1954). Dans nos conditions expérimentales, nous avons mis en évidence :

1) à basse fréquence (20 KHz, 2,3 W/cm²) des actions mécaniques,
2) à haute fréquence (800 KHz, 1,3 W/cm²) des actions mécaniques et chimiques.

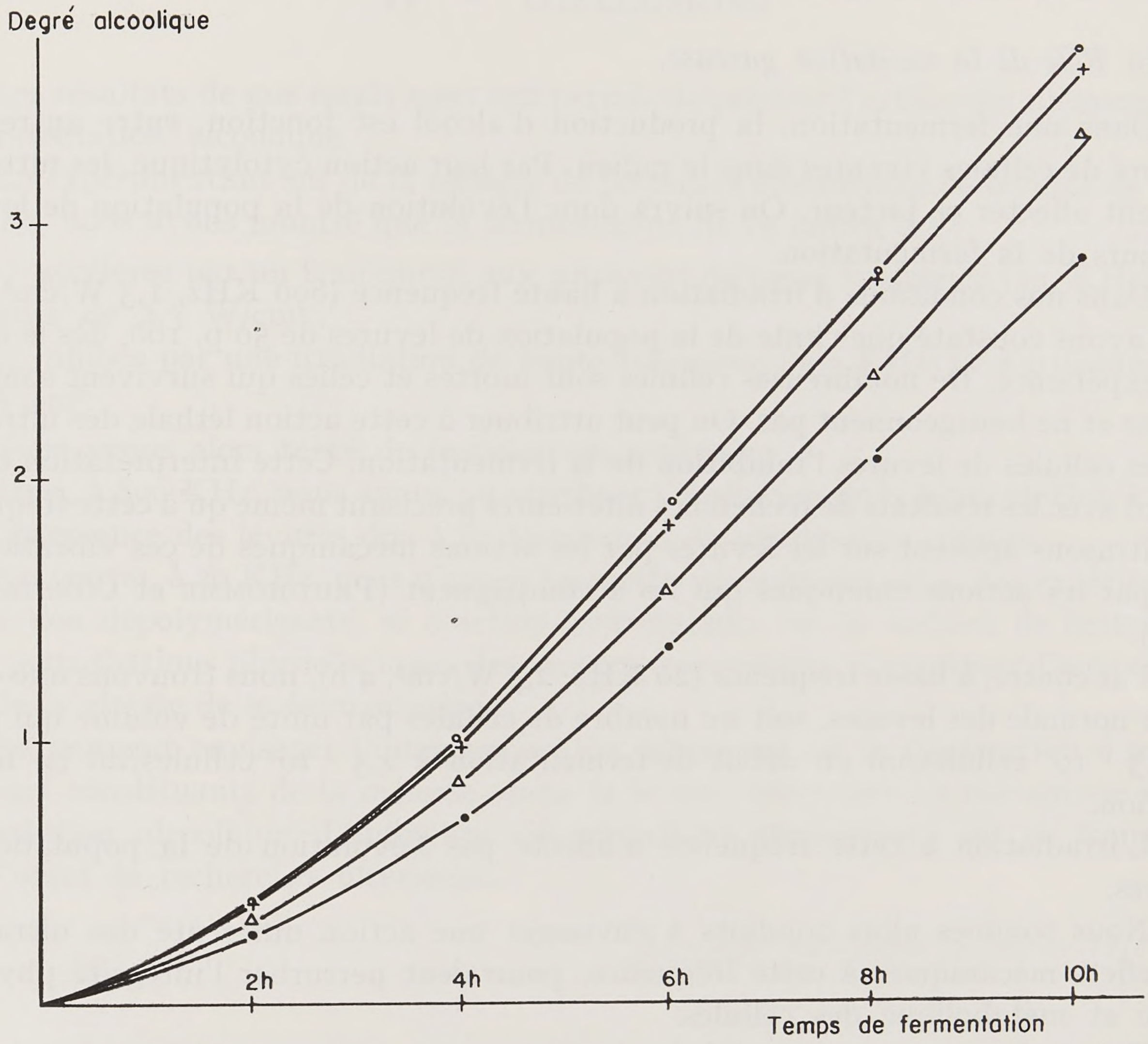


FIG. 3. — *Cinétique de formation d'éthanol en fonction du temps d'irradiation*

1 ○———○ Irradié 10 h
2 +———+ Irradié 4 h
3 △———△ Irradié 2 h
●———● Témoin sans irradiation

Quel est le rôle de ces effets sur les cinétiques de formation d'éthanol dans nos fermentations?

Action sur les levures.

a) *Rôle des mouvements vibratoires.*

Nous avons pensé tout d'abord à l'action du déplacement vibratoire des particules dans un champ ultrasonore (déplacement alternatif entre un nœud et un ventre de vibration). En effet, ce phénomène peut entraîner une dispersion des amas de levures et par-là même une augmentation de la vitesse de fermentation. On pourrait aussi envisager un meilleur renouvellement des constituants du milieu nutritif au niveau de la membrane de la cellule par micro-agitation, ce qui aboutirait aux mêmes résultats.

Bien qu'il soit difficile de reproduire, par des moyens mécaniques, le mouvement vibratoire engendré par les ultrasons, nous avons voulu voir l'action d'une agitation sur la fermentation. Les résultats obtenus dans ces conditions sont très comparables à ceux d'une fermentation normale. Il semble donc que l'on puisse éliminer ce mécanisme d'action sur les effets constatés.

b) *Rôle de la cavitation gazeuse.*

Dans une fermentation, la production d'alcool est fonction, entre autres, du nombre de cellules vivantes dans le milieu. Par leur action cytolytique, les ultrasons peuvent affecter ce facteur. On suivra donc l'évolution de la population de levures au cours de la fermentation.

Dans nos conditions d'irradiation à haute fréquence (800 KHz, 1,3 W/cm^2, 4 h) nous avons constaté une chute de la population de levures de 50 p. 100, dès le début de l'expérience. De nombreuses cellules sont mortes et celles qui survivent sont très petites et ne bourgeonnent pas. On peut attribuer à cette action léthale des ultrasons sur les cellules de levures l'inhibition de la fermentation. Cette interprétation est en accord avec les résultats de recherches ultérieures précisant même qu'à cette fréquence les ultrasons agissent sur les levures par les actions mécaniques de ces vibrations et non par les actions chimiques qui les accompagnent (PRUDHOMME et CONSTANTIN, 1963).

Par contre, à basse fréquence (20 KHz, 2,3 W/cm^2, 4 h), nous trouvons une croissance normale des levures, soit un nombre de cellules par unité de volume qui passe de $6{,}5 \cdot 10^7$ cellules/ml en début de fermentation à $2{,}5 \cdot 10^8$ cellules/ml en fin de réaction.

L'irradiation à cette fréquence n'affecte pas l'évolution de la population de levures.

Nous sommes alors conduits à envisager une action différente des ultrasons. Les effets mécaniques, à cette fréquence, pourraient perturber l'intégrité physiologique et métabolique des cellules.

Pour cela, nous avons traité des levures seules. Mais après les avoir mises en fermentation, l'étude de la production d'alcool s'est révélée analogue à celle d'un témoin. Nous devons exclure cette hypothèse.

Action sur la mélasse de betterave.

Les actions mécaniques des ultrasons peuvent provoquer des dépolymérisations, aussi avons-nous pensé à ce type d'effet sur la mélasse de betterave qui contient des polymères naturels tels que pectine, gomme arabique.

Nous avons irradié la mélasse seule à 20 KHz, 2,3 W/cm^2, 4 h. Après addition de levures, nous mettons en fermentation. L'étude de la formation d'éthanol, dans ces conditions, est analogue à celle d'un témoin. Les ultrasons n'ont pas d'action dépolymérisante, dans ce cas précis.

Quant à l'inversion du saccharose, en milieu neutre, par les ultrasons, nous l'envisagerons puisque les résultats trouvés dans la littérature sont des plus divergents (SZENT-GYÖRGYI, 1933 ; LLIBOUTRY, 1944).

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons soumis la mélasse aux ultrasons dans les conditions déjà décrites (20 KHz, 2,3 W/cm^2). Après 4 heures de traitement, nous

n'avons pu mettre de glucose en évidence. On doit donc écarter l'hypothèse d'une coupure mécanique de la molécule de saccharose.

IV. — CONCLUSIONS

Les résultats de nos essais nous ont permis de préciser l'action des ultrasons sur la fermentation alcoolique.

En expérimentant sur de la mélasse de betterave ensemencée de levures de boulangerie, nous avons montré que la fermentation de ce milieu est :

1) accélérée par un traitement aux ultrasons de basse fréquence (20 KHz) et à puissance de 2,3 W/cm^2 ;

2) inhibée par une irradiation de haute fréquence (800 KHz) et à puissance de 1,3 W/cm^2.

Nous avons alors tenté de justifier ces actions.

Ainsi, à 800 KHz, nous avons pu attribuer l'inhibition de la fermentation à celle de la croissance des levures due à la destruction de nombreuses cellules.

Par contre, à 20 KHz, nous n'avons pu mettre en évidence, dans nos expériences, ni d'action dépolymérisante, ni d'action hydrolysante sur la mélasse de betterave, ni de perturbations physiologiques des levures, susceptibles d'expliquer l'augmentation de la vitesse de la fermentation.

On pourrait envisager l'intervention des ultrasons sur la pénétration d'un ou plusieurs constituants de la mélasse, dans la levure, nécessaire au mécanisme de la fermentation alcoolique. L'influence des vibrations ultrasonores sur ce transport sera l'objet de recherches ultérieures.

Reçu pour publication en janvier 1976.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. Gourmelen du Bureau d'études de l'A.I.B.A. de nous avoir transmis les résultats de ses expériences, et pour les précieux conseils qu'il nous a prodigués.

Nous remercions également M. Sontag de la Société Fould Springer qui a aimablement mis à notre disposition le matériel biologique nécessaire.

SUMMARY

INFLUENCE OF ULTRASOUNDS ON THE ALCOHOLIC FERMENTATION OF BEET MOLASSES BY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

The influence of ultrasounds on the alcoholic fermentation through yeasts was studied according to the ultrasonic frequency, the acoustic power and the irradiation time. The alcohol production speed is increased through a low frequency treatment. An inhibition of the fermentation is observed with a high frequency treatment.

The effects of ultrasounds in liquid medium know we aimed at determining the role of the latter in the fermentation progress. The cytolytic effect of ultrasounds allowed us to interpret the results obtained at high frequency, but at low frequency the different hypotheses considered could not explain the increase of the fermentation speed.

RESUMEN

ACCIÓN DE LOS ULTRASONIDOS SOBRE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA DE LA MELAZA DE REMOLACHA POR *SACCHAROMYCEE CEREVISIAE*

La influencia de los ultrasonidos respecto a la fermentación alcohólica por las levaduras ha sido sometida a estudio en función de la frecuencia ultrasonora, la potencia acústica y el lapso de irradiación. La velocidad de producción de alcohol queda aumentada por un tratamiento a baja frecuencia. Si se procede con alta frecuencia, se observa una inhibición de la fermentación.

Siendo ya conocidos los efectos de los ultrasonidos en medio líquido, hemos deseado determinar su papel en la evolución cde la fermentación. La acción citolítica de los ultrasonidos ha permitido interpretar los resultados obtenidos a alta frequencia, pero cabe decir que, al proceder con baja frecuencia, la distintas hipótesis vislumbradas no han permitido explicar el aumento de la velocidad de fermentacíon.

RIASSUNTO

AZIONE DEGLI ULTRASUONI SULLA FERMENTAZIONE ALCOOLICA DELLA MELASSA DI BARBABIÈTOLA PER *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

L'influenza degli ultrasuoni sulla fermentazione alcoolica mediante lieviti è studiata in funzione della frequenza ultrasonora, della potenza acustica e del tempo d'irriggiamento. La velocità di produzione dell'alcool viene aumentata tramite un trattamento a bassa frequenza. Una inibizione della fermentazione è osservata ad alta frequenza.

Conoscendo gli effetti degli ultrasuoni in mezzo liquido, abbiamo voluto determinare il ruolo di questi ultimi nell'evoluzione della fermentazione. L'azione citolitica degli ultrasuoni ha consentito di interpretare i risultati ottenuti ad alta frequenza, ma a bassa frequenza, le diverse ipotesi emesse non sono state in grado di spiegare l'aumento della velocità di fermentazione.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anderson J. M., 1953. Effects of ultrasonic radiation on growth and fermentation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioch. Bioph. Acta*, **11**, 122-137.

Euler H. V., Skarzinski B., 1934. Einwirkungen von Ultraschallwellen auf Hefe. *Naturwiss.*, **31**, 389.

Fink H., Kuhles R., 1933. Beiträge zur Methylenblaufarbüng der Hefezellen und studien über die Permeabilität der Hefezellmembran. *Woch. Brauer*, **50**, 185.

Flanzy M., Bouzigues L., Bouzigues H., 1955. La détermination chimique du degré alcoolique du vin par le mélange sulfochromique. *Ann. Technol. Agric.*, (4), 397-415.

Katzelson R. S., Khenokh M. A., 1951. Effect of ultrasound on yeasts. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **76**, 133-135.

Lliboutry L., 1944. Influence des ultrasons sur quelques réactions chimiques. *J. Chim. Phys.*, **41**, 173-186.

Prudhomme R. O., 1954. *Mécanisme des effets chimiques et dépolymérisants des ultrasons.* Thèse Doctorat d'État, Paris.

Prudhomme R. O., Constantin T., 1963. Action des ultrasons sur *Saccharomyces cerevisiae*. I. Courbes de survie en présence de différents gaz. *C. R. Soc. Biol.*, **157**, 489-493.

Szent-Györgyi, 1933. Chemical and biological effects of ultrasonic radiation. *Nature*, **131**, 278.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (2), 125-142.

VOIES DE CATABOLISME DU MALATE AU COURS DU MÉTABOLISME ANAÉROBIE DES BAIES DE RAISIN

C. FLANZY, P. ANDRÉ, M. BURET, Y. CHAMBROY et P. GARCIA
av^c la collaboration technique de Sylvie LARA et M. TACCHINI

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon,
84140 Montfavet

RÉSUMÉ

Afin de préciser le devenir du malate au cours du métabolisme anaérobie du raisin, on a injecté du malate-3-^{14}C dans des baies de *Carignan* placées à l'obscurité, à 35°C, dans une atmosphère de gaz carbonique. L'injection du malate marqué a été faite en présence ou en l'absence d'oxalate non marqué, inhibiteur de l'enzyme malique (EC 1.1.1.40).

Les analyses des échantillons fixés après 3 et 7 jours d'anaérobiose ont porté sur le dosage de substrats variés, acides organiques, acides aminés, produits de la glycolyse, ainsi que sur la mesure des activités de l'enzyme malique-NADP$^+$ (EC 1.1.1.40) et de la malatedéhydrogénase (EC 1.1.1.37).

La radioactivité se retrouve principalement dans l'éthanol, le γ-aminobutyrate, l'ensemble non séparé glycérate-shikimate, le succinate. L'enzyme malique intervient dans la première séquence d'une voie conduisant du malate à l'éthanol. La synthèse d'alanine semble favorisée par la présence d'oxalate.

Les résultats obtenus et certaines hypothèses avancées dans la littérature conduisent à proposer un schéma d'utilisation du malate durant le métabolisme anaérobie du raisin.

Mots clés :*métabolisme anaérobie, raisin, catabolisme malate, enzyme malique.*

INTRODUCTION

Au cours du métabolisme anaérobie des baies de raisin, le malate paraît tenir le rôle d'un substrat-clé. En effet, il est partiellement synthétisé à partir du CO_2 formant l'atmosphère des enceintes expérimentales (FLANZY *et al.*, 1968, 1969) et, d'autre part, sa concentration dans les mêmes baies diminue durant les premiers jours de l'anaérobiose (FLANZY *et al.*, 1967 *a*, 1967 *b*).

Les voies de catabolisme du malate dans le raisin placé en atmosphère de CO_2 ont déjà fait l'objet de recherches au moyen d'acide malique-3-^{14}C (FLANZY, BURET et

CHAMBROY, 1971). Les résultats obtenus montrent que, 9 heures après l'apport du substrat marqué, la radioactivité se retrouve pour une bonne part dans les produits réducteurs volatils et, à un degré moindre, dans le succinate, le citrate, les acides aminés et le shikimate.

L'utilisation d'inhibiteurs des réactions enzymatiques comme la parabenzoquinone et l'arsénite de sodium n'a pas permis de préciser les différentes étapes des chemins suivis par le ^{14}C du malate radioactif injecté dans les baies (FLANZY, 1971). Il en a été de même après incorporation d'acétate de sodium-2-^{14}C et d'acide γ-aminobutyrique-1-^{14}C (résultats non publiés).

En revanche, l'utilisation d'acide fumarique-2,3-^{14}C a mis en évidence, dans nos conditions expérimentales, l'existence d'une filiation fumarate $\longrightarrow$ succinate (résultats non publiés). Des travaux sur levures placées en conditions « d'hypoxie » semblent montrer la possibilité d'une scission du cycle de Krebs en deux branches actives (NUÑEZ DE CASTRO *et al.*, 1974).

D'autre part, l'évolution de l'activité spécifique de l'enzyme malique-NADP$^+$ (EC 1.1.1.40) a été mesurée au cours du métabolisme anaérobie du raisin par GARCIA *et al.* (1974). Cette enzyme pourrait jouer un rôle important dans le phénomène considéré (RANSON, 1953 ; FLANZY *et al.*, 1971). L'oxalate est signalé comme inhibiteur de EC 1.1.1.40 chez les protozoaires (MARR, 1973). Son action inhibitrice sur l'enzyme malique du raisin est confirmée par GARCIA (1975).

La publication actuelle a pour objet de faire la synthèse de nos connaissances sur le devenir du malate dans les périodes de son catabolisme intense (2 à 4 jours d'anaérobiose à 35°C) puis ralenti (5 à 8 jours). Cette mise au point s'appuie d'une part sur des hypothèses proposées dans la littérature et, d'autre part, sur nos propres résultats. Ceux-ci se divisent en deux groupes. Le premier comprend des données relativement anciennes et ayant été ou non publiées. L'autre se rapporte à un essai réalisé en 1974. Ce dernier essai, présenté d'une façon détaillée dans l'article, a permis d'associer les dosages de substrats et la recherche de la distribution de la radioactivité aux dosages d'activité de l'enzyme malique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Protocole expérimental

Huit échantillons de 200 baies chacun (*Carignan* noir) provenant du domaine expérimental de Pech-Rouge (I.N.R.A., Gruissan) sont constitués selon la technique précédemment décrite (FLANZY *et al.*, 1974).

Après lavage à l'eau distillée et séchage des baies sur papier filtre, les échantillons sont groupés par deux séries de quatre ; l'une de celles-ci est destinée au dosage des métabolites, l'autre à la mesure d'activités enzymatiques.

L'échantillon numéro 1 de chaque série servant de témoin initial est fixé immédiatement selon le protocole présenté à la fin de ce chapitre. Les autres lots sont portés à 35°C par un séjour préalable de 4 heures en étuve aérée. Les échantillons de la série « métabolites » reçoivent alors une incorporation d'acide malique-3-^{14}C. En outre, de l'acide oxalique est injecté dans les fruits des lots numéro 3 des deux séries (tabl. 1).

La technique d'apport de substrat à chaque baie a déjà été précisée (FLANZY *et al.*, 1971). Une solution aqueuse (2,5 μl) d'acide malique-3-^{14}C est injectée dans chaque fruit. L'ensemble du lot contient donc 500 μl de solution correspondant environ à 1,25 μM d'acide malique dont la radioactivité totale est de 30 μCi et la radioactivité spécifique de 24 mCi/mM. Chaque baie

des lots numéro 3 reçoit, par la même injection, 5 µl de solution saturée (2 mM/ml) d'acide oxalique soit 2 mM de cet acide pour la totalité du lot. Ramenée à la quantité estimée de moût contenu dans les 200 baies (513 ml), la concentration moyenne d'acide oxalique est de l'ordre de 3,8 µM/ml de moût.

TABLEAU I

Incorporation d'acide malique-3-^{14}C par des baies de raisin placées en anaérobiose : schéma expérimental

MA x jours : durée du métabolisme anaérobie de baies de *Carignan* en atmosphère de CO_2 à 35°C.

mal. 3-^{14}C : injection au temps $t = 0$ (MA = 0 jours) dans l'ensemble des baies (200) de l'échantillon de 500 µl d'une solution aqueuse d'acide malique-3-^{14}C correspondant à une radioactivité totale de 30 µCi.

oxal. : injection au temps $t = 0$ (MA = 0 jours) dans l'ensemble des baies de l'échantillon de 1 000 µl d'une solution aqueuse d'acide oxalique à 2 millimoles par millilitre.

Échantillon numéro	1	2	3	4
Série métabolites	MA = 0 jours Témoin initial	MA : 3 jours 30 µCi mal.-3-^{14}C	MA : 3 jours 30 µCi mal.-3-^{14}C 2 mM oxal.	MA : 7 jours 30 µCi mal.-3-^{14}C
Série enzymologie	MA = 0 jours Témoin initial	MA : 3 jours	MA : 3 jours 2 mM oxal.	MA : 7 jours

Chaque lot est enfermé dans une enceinte (1 600 ml) dont l'atmosphère est balayée par 8 litres de CO_2 gazeux amené à 35°C. La concentration finale de ce gaz dans le récipient expérimental est supérieure à 98 p. 100. Les enceintes sont placées dans une chambre noire thermostatée à 35°C. L'atmosphère des récipients est maintenue à la pression atmosphérique par piégeage du CO_2 excédentaire. Celui-ci est obtenu en reliant chaque enceinte à deux flacons barbotteurs montés en série et contenant une solution éthanolique de soude N/10.

Les lots numéros 2 et 3 sont fixés après 3 jours de métabolisme anaérobie, les lots numéro 4 sont prélevés après 7 jours d'anaérobiose (tabl. 1). Pour cela, après balayage de leur atmosphère par un courant d'argon suivi d'un piégeage du CO_2 dans la soude éthanolique, les enceintes sont ouvertes. Les baies sont déparaffinées puis pressurées par un appareil pneumatique exerçant une pression maximale de 3 kg/cm^2. Le pressurage est répété une deuxième fois après rebêchage des pulpes.

Dans la série « enzymologie » les pulpes pressées sont traitées selon une technique originale (Garcia, 1975).

Le moût obtenu dans les échantillons de la série « métabolites » est centrifugé 10 minutes à 2 400 *g*. Des parties aliquotes du surnageant sont alors fixées différemment selon le but poursuivi : congélation (— 25°C) pour la titration des produits réducteurs volatils ; 2,4-dinitrophénylhydrazine pour la mesure de radioactivité des acides cétoniques ; éthanol bouillant durant 2 minutes pour le dosage des acides organiques non cétoniques, des acides aminés libres, des substances neutres. En outre, cette dernière fixation permet de mesurer la radioactivité totale des protéines et des lipides après isolement des fractions correspondantes.

Méthodes d'analyses

Les techniques de dosage d'activités de l'enzyme malique (EC 1.1.1.40) et de la malate déhydrogénase (EC 1.1.1.37) ont été précisées antérieurement (Garcia, 1975).

Le schéma général de séparation et de dosage des acides organiques, des acides aminés, des substances neutres et des protéines est tiré de l'étude de Jolivet (1969). Les lipides sont isolés selon Fowler (1973). Les acides « shikimique + glycérique », malique, tartrique, « citrique + isocitrique » sont isolés par chromatographie d'échange d'ions selon une technique dérivée de celle proposée par Roux et Lesaint (1959). Les acides succinique et « fumarique + inconnu » sont obtenus par chromatographie de partage sur gel de silice selon Morot-Gaudry, Nicol et Jolivet (1973).

Un analyseur automatique par chromatographie d'échange d'ions (Biocal) est utilisé pour le dosage des acides aminés. Une deuxième fraction de l'extrait est chromatographiée dans les mêmes conditions. Cette opération permet la mesure ultérieure de la radioactivité de chaque acide aminé principal après récupération de fractions aliquotes de l'effluent (BAUDET, communication personnelle).

Les produits réducteurs volatils formés principalement d'éthanol sont isolés puis dosés par les techniques déjà décrites (FLANZY *et al.*, 1969).

Les radioactivités incorporées dans chaque substrat sont déterminées au moyen d'un appareil à scintillation liquide Intertechnique SL 30. Chaque flacon de comptage contient 10 ml de mélange scintillateur (Instagel Packard) et 100 µl de solution aqueuse renfermant la substance radioactive ; la solution est préparée selon la technique de JOLIVET (communication personnelle). Le SL 30 possédant un système de source externe (Cs) des courbes de correction d'atténuation ont été établies pour les 2,4-dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques et pour le rouge de phénol; cet indicateur coloré sert au dosage titrimétrique des acides organiques.

Les autoradiogrammes des chromatographies de partage sur plaques sont effectuées selon une technique déjà décrite (FLANZY *et al.*, 1968).

Expression des résultats

Les résultats sont ramenés à 200 baies au moyen du coefficient théorique de 1,2 liant le poids des baies de *Carignan* au volume du moût correspondant, dans nos conditions expérimentales (FLANZY *et al.*, 1974).

Les radioactivités sont, en outre, rapportées à la radioactivité totale incorporée dans le numéro 3. En effet, d'après les mesures d'activité des solutions mères (compte non tenu du rendement du système de comptage), les quantités de ^{14}C injectées correspondent à : 17 µCi pour le lot numéro 2, 19 µCi pour le lot numéro 3 et 14,5 µCi pour le lot numéro 4.

Remarques

1. Le volume de liquide exogène injecté dans chaque baie est négligeable par rapport au volume du moût (1 à 3 p. 100).

2. Les concentrations du malate et de l'oxalate injectés dans les baies doivent décroître des zones proches de l'émission de solution radioactive aux zones éloignées. Dans ces conditions, si la concentration moyenne d'oxalate est faible, la teneur en inhibiteur dans certaines zones des baies peut correspondre aux valeurs recommandées dans la littérature (MARR, 1973).

3. Les dosages de métabolites sont effectués sur le moût alors que les activités enzymatiques sont mesurées à partir des pulpes dont le jus a été enlevé.

RÉSULTATS

La radioactivité récupérée dans les substrats isolés du moût est distribuée principalement dans les trois groupes suivants : acides organiques, substances neutres, produits réducteurs volatils, acides aminés libres (tabl. 2).

Indépendamment du malate, les métabolites les plus marqués après 3 jours d'anaérobiose sont par valeurs décroissantes de radioactivité totale (tabl. 3) : éthanol, γ-aminobutyrate, sucres, « glycérate + shikimate ». Cet ordre est légèrement modifié après 7 jours de métabolisme anaérobie : éthanol, « glycérate + shikimate », γ-aminobutyrate, sucres.

Le classement des radioactivités spécifiques subit aussi quelques transformations entre le troisième et le septième jour d'expérience. Il passe, en effet, par la série : aspartate, γ-amino butyrate, succinate, « glycérate + shikimate », citrate, glutamate, éthanol. Il aboutit à l'enchaînement : aspartate, « glycérate + shikimate », succinate et γ-aminobutyrate, citrate, glutamate et éthanol.

Un ensemble de remarques doit être pris en compte lors de l'interprétation des tableaux 2 et 3.

Les concentrations et les radioactivités totales du succinate et du fumarate ne sont connues que par défaut. Les deux acides sont dosés dans la fraction éluée par le $(NH_4)_2CO_3$ 6 p. 100 alors qu'une quantité non précisée est extraite accidentellement par la solution de $(NH_4)_2CO_3$ 0,9 p. 100. Cette extraction fâcheuse est due, vraisemblablement, au fait que les carbonates employés contiennent des carbamates en proportion variable (JOLIVET et MOROT-GAUDRY, communication personnelle). Cependant, calculées à partir de la fraction isolée où concentration et radioactivité du substrat sont exactement mesurées, les valeurs de la radioactivité spécifique du succinate sont correctes.

TABLEAU 2

Incorporation d'acide malique-^{3-14}C par des baies de raisin placées en anaérobiose : pourcentage de distribution, dans les différentes fractions isolées, de la radioactivité totale récupérée

Numéro échantillon	2	3	4
Produits réducteurs volatils	39	25	52
Acides organiques non cétoniques	47	66	34
Acides aminés libres	10	5	11
Sucres	1	1	< 1
Protéines	< 1	< 1	/
Acides cétoniques	< 1	< 1	< 1

Il n'en est pas de même pour la radioactivité spécifique du fumarate. Pour ce métabolite, un dédoublement de taches apparaît après chromatographie sur plaques de l'effluent correspondant à la sortie du fumarate. L'une des taches correspond bien à cet acide, l'autre présente les caractéristiques du témoin d'acide hydroxybutyrique. Si une telle détermination était correcte, la radioactivité spécifique du fumarate serait sous-évaluée.

Glycérate et shikimate sont élués en même temps, le premier nommé paraissant quantitativement le plus important. Citrate et isocitrate ne peuvent être dissociés.

Les autoradiogrammes se révèlent positifs pour les acides fumarique, succinique, malique, citrique, glycérique, γ-aminobutyrique et pour l'éthanol.

Les mesures d'activité de l'enzyme malique montrent une légère augmentation au troisième jour par rapport à celle du départ, suivie d'une chute sensible au septième jour (tabl. 3). L'oxalate réduit de plus de moitié l'activité de l'enzyme malique des pulpes alors qu'il paraît sans effet sur l'activité de la malatedéhydrogénase.

TABLEAU 3

Incorporation d'acide malique^{-3-14}C dans des baies de raisin placées en anaérobiose : résultats

Les conditions expérimentales sont données dans le tableau 1.

Les résultats sont ramenés à 200 baies et à la radioactivité incorporée dans l'échantillon 3. Ils sont exprimés en micromoles (μmol), en impulsions par minute (ipm = Radioactivité totale), en impulsions par minute et par micromole (ipm/μmol = Radioactivité spécifique).

	Échantillon 1	Échantillon 2			Échantillon 3			Échantillon 4		
	μmol	μmol	RS	RT	μmol	RS	RT	μmol	RS	RT
Produits réducteurs volatils	0	78 600	111	8 700 · 10^3	67 000	49	3 305 · 10^3	115 200	103	11 855 · 10^3
Sucres réducteurs	—	430 000	1	432 900	520 000	1 <	230 000	442 000	1 <	91 580
Ac. malique	14 813	12 350	792	9 788 · 10^3	12 394	651	8 068 · 10^3	5 998	1 066	6 393 · 10^3
Ac. fumarique + ?	—	347	33	11 555	254	50	12 700	315	127	40 131
Ac. succinique	—	304	680	206 850	330	297	98 010	187	564	105 505
Ac. citrique + isocitrique	—	200	231	46 176	296	248	73 408	311	228	70 908
Ac. glycérique + shikimique	—	950	282	267 843	1088	177	192 576	769	1 482	1 140 · 10^3
Ac. tartrique	21 458	26 125	1	28 998	14 557	1	14 557	19 827	1	19 827
Ac. aspartique	38	4	1 684	6 908	7	1 260	8 618	6	2 427	14 938
Ac. glutamique	228	10	208	2 125	14	0	0	12	104	1 245
Proline	2 038	1 710	15	27 636	1 819	1 <	1 436	2 736	8	28 010
Alanine	188	46	34	1 593	86	106	9 097	42	102	4 356
Ac. γ-aminobutyrique	294	1 211	1 492	1 807 · 10^3	1 294	338	437 144	1 778	558	990 925
EC 1.1.1.40 10^{-4} μmol NADPH · mn^{-1} · ml^{-1} · mg^{-1}	324	362			162			200		
EC 1.1.1.37 Unités D. O. mn^{-1} · mg^{-1}	300	245			240			210		

DISCUSSION

Évolutions des systèmes enzymatiques étudiés

Comme il a été précisé au chapitre « Matériel et méthodes », les dosages de métabolites sont effectués sur le moût alors que les activités enzymatiques sont mesurées à partir des pulpes dont le jus a été enlevé. Avant de mettre en parallèle les deux types de résultats, il convient de s'interroger sur leur signification respective et sur la validité des relations qui pourraient apparaître entre eux.

En première analyse, notre technique d'extraction semble mettre en évidence une localisation différente de l'enzyme malique et des métabolites concernés par le métabolisme anaérobie. La recherche et la mesure d'une activité enzyme malique dans le moût (contenu vacuolaire) sont nécessaires pour une interprétation correcte de cette observation. En effet, l'enzyme étudiée pourrait être une enzyme cytoplasmique appartenant au même compartiment cellulaire que celle, hypothétiquement, extraite au pressurage et rejetée avec le moût. Une telle rétention par la fraction pulpe de protéines enzymatiques solubles serait explicable par un lavage insuffisant de cette fraction lors de la phase de préparation du matériel végétal en vue des analyses enzymatiques (FALLOT, communication personnelle). Le milieu d'extraction des pulpes diffère peu, en effet, de la solution de préparation (GARCIA, 1975).

La littérature donne de nombreux exemples de localisations différentes de l'enzyme malique : mitochondriale, cytoplasmique, chloroplastique (TING, SHERMAN et DUGGER, 1966 ; MUKERJI et TING, 1968 ; FRENKEL, 1972 ; SAÏTO et TOMITA, 1973). Il est vraisemblable que, par notre technique, le traitement appliqué à la pulpe ne soit pas suffisamment brutal pour briser la structure des mitochondries et libérer les enzymes qu'elles contiennent. D'autre part, le métabolisme anaérobie du raisin a davantage de chances de se dérouler au niveau du cytoplasme plutôt que dans les mitochondries : les chaînes respiratoires ne sont pas favorisées par les conditions de milieu. Des observations antérieures (FLANZY, BURET et CHAMBROY, 1971) et d'autres données de la littérature (HARTMAN et KEEN, 1973 ; HÖLL, 1974) militent en faveur de l'hypothèse selon laquelle carboxylations et décarboxylations du malate s'effectueraient dans le cytoplasme.

Enfin, si la proportion des différentes catégories d'enzymes retenues sur la pulpe était égale à celle retrouvée dans le moût, l'activité spécifique mesurée de l'enzyme malique correspondrait effectivement à son activité spécifique vraie.

Compte tenu des réserves précédentes, la comparaison des évolutions respectives des caractéristiques des métabolites d'une part, de l'activité de l'enzyme malique d'autre part, présente un intérêt certain (tabl. 3).

Au troisième jour, sans inhibiteur, l'activité de l'enzyme malique est légèrement plus forte que celle du départ et elle est très supérieure à celle mesurée après 7 jours. Ceci est en accord avec la cinétique d'activité de l'enzyme malique établie au cours du métabolisme anaérobie (GARCIA *et al.*, 1974). La synthèse de l'enzyme pourrait être favorisée dans les premiers jours d'anaérobiose.

Le lot ayant subi une injection d'oxalate présente une activité « enzyme malique » nettement plus faible que celle du lot n'ayant pas reçu d'inhibiteur. Les

activités sont mesurées, évidemment, en l'absence d'oxalate après purification de l'extrait enzymatique. Il est donc possible, comme l'a déjà noté l'un d'entre nous (BURET, travaux en cours), que la présence d'oxalate dans la baie diminue la synthèse de l'enzyme malique. Ceci apporte un argument supplémentaire à l'idée d'un renouvellement de cette enzyme au cours du métabolisme anaérobie.

Relation malate ⟶ produits réducteurs volatils

Quarante à 50 p. 100 de la radioactivité récupérée se retrouvent dans les produits réducteurs volatils (tabl. 2). Ce résultat confirme l'existence d'une synthèse d'éthanol à partir du malate (FLANZY, BURET et CHAMBROY, 1971 ; FLANZY, 1971).

La voie avancée par RANSON (1953) pour expliquer la filiation malate ⟶ éthanol dans les tissus végétaux placés en atmosphère enrichie en CO_2 trouve ici un début de vérification. Le premier chaînon de cette voie consiste en la décarboxylation du malate en pyruvate sous l'action de l'enzyme malique (EC 1.1.1.40) dont l'inhibition par l'acide oxalique a été démontrée chez les protozoaires (MARR, 1973). Or, l'addition d'acide oxalique à la solution injectée dans les baies conduit à des diminutions de radioactivité totale (62 p. 100) et de radioactivité spécifique (55 p. 100) de l'éthanol ainsi qu'à une chute d'activité spécifique (55 p. 100) de l'enzyme malique. Le schéma suivant devient donc plausible :

malate ⟶ pyruvate ⟶ éthanal ⟶ éthanol.

La part de cette filiation dans la formation totale d'éthanol au cours du métabolisme anaérobie peut-être estimée. En effet, une mole de malate donnant une mole d'éthanol dans l'hypothèse considérée, le rapport

$$\frac{\text{radioactivité totale récupérée dans l'éthanol}}{\text{radioactivité d'une mole de malate injecté}}$$

correspond à la quantité d'éthanol synthétisée à partie de l'acide malique radioactif apporté. Soient X moles. Connaissant la quantité de malate Y injecté, nous calculons la valeur du pourcentage de malate-3-^{14}C transformée en éthanol : $\frac{X \times 100}{Y}$. Nous obtenons respectivement 20 p. 100 après 3 jours et 30 p. 100 après 7 jours. Notons qu'après 8 heures d'anaérobiose 10 p. 100 du malate étaient déjà transformés en éthanol (FLANZY, BURET et CHAMBROY, 1971).

En admettant que le malate endogène et le malate radioactif apporté suivent la même voie (compartiment identique) et que, d'autre part, la néosynthèse de malate à partir du CO_2 interne soit négligeable, nous pouvons apprécier la part de malate catabolisée en éthanol. Cet éthanol représente moins de 1 p. 100 des produits réducteurs totaux après 3 jours et, environ, 2 p. 100 après 7 jours de métabolisme anaérobie.

Relation malate ⟶ succinate

La formation de succinate dans les tissus végétaux stockés en atmosphère enrichie en CO_2 est bien connue (BENDALL, RANSON et WALKER, 1960 ; WILLIAMS et PATTERSON, 1964 ; FLANZY *et al.*, 1967, *a b*).

La radioactivité spécifique relativement importante du succinate dans notre

essai peut traduire la présence d'une liaison assez directe avec le malate. Les hypothèses avancées précédemment pour expliquer cette liaison n'ont pu être vérifiées (FLANZY, BURET et CHAMBROY, 1971 ; travaux non publiés).

Récemment, la possibilité de réduction du fumarate en succinate au cours du métabolisme anaérobie des raisins a été mise en évidence (travaux non publiés). Ce résultat est en accord avec la théorie selon laquelle, chez *Saccharomyces cerevisiae* placée en anaérobiose, le cycle de Krebs serait scindé en deux branches : l'une reliant l'oxaloacétate au succinate par le malate et le fumarate, l'autre allant de l'oxaloacétate au glutamate (NUÑEZ DE CASTRO *et al.*, 1974). En effet, en l'absence d'oxygène, la synthèse d'α-cétoglutaratedéhydrogénase (EC 1.2.4.2.) de la levure serait fortement réprimée alors que du succinate s'accumule (LUPIAÑEZ *et al.*, 1974).

Une analogie apparaît entre les effets de l'anaérobiose et ceux d'une addition de Rindite, mélange utilisé pour lever la dormance d'organes végétaux (DENNY, 1945). En effet, dans des couronnes de tubercules de pomme de terre traités par la Rindite, JOLIVET (1969) observe une accélération du fonctionnement de la réaction oxaloacétate ⟶ malate. En outre, la conversion du malate en fumarate semble probable et de fortes doses de Rindite créent un effet réducteur suffisant pour réaliser la transformation fumarate ⟶ succinate. Pour MCMANUS et JAMES (1975), la réaction de réduction du fumarate en succinate agirait comme un accepteur final d'hydrogène au cours de l'anaérobiose des mollusques.

L'oxalate, inhibiteur de l'enzyme malique, devrait favoriser la formation des métabolites constituant la branche réductrice du cycle de Krebs au-delà du malate. C'est ainsi qu'au cours de la fermentation aérobie des protozoaires MARR (1973) note une chute de la quantité de pyruvate mais une augmentation de la teneur en succinate. Il n'en est pas de même dans notre essai. L'addition d'oxalate provoque une diminution (55 p. 100) de la radioactivité spécifique du succinate. En revanche, la radioactivité spécifique du fumarate semble augmenter. L'inhibiteur agit-il sur la « fumarate réductase » (AMARASINGHAM et DAVIS, 1965 ; MACHADO, NUÑEZ DE CASTRO et MAYOR, 1974) ? Le succinate est-il synthétisé par une autre voie dont l'une des séquences est affectée par l'oxalate?

L'intérêt d'une nouvelle théorie expliquant l'accumulation de lactate, succinate et alanine dans les cellules des tissus musculaires de vertébrés marins en plongée sera discuté dans le paragraphe relatif à l'alanine.

Relation malate ⟶ acides aminés

Pour la plupart des acides aminés étudiés et pour le γ-aminobutyrate les teneurs retrouvées dans notre essai correspondent aux quantités habituellement mesurées au cours du métabolisme anaérobie (FLANZY, 1971 ; travaux non publiés). Cependant, la proline présente, au départ, une valeur très supérieure à la normale ; d'autre part, les concentrations d'alanine au troisième et au septième jour sont faibles.

Aspartate-alanine.

La radioactivité spécifique de l'aspartate est la plus élevée de celles du groupe des acides aminés. La présence d'oxalate n'affecte pas sensiblement sa radioactivité totale et sa radioactivité spécifique. La radioactivité de l'alanine augmente au contraire fortement (radioactivité totale = 450 p. 100 ; radioactivité spécifique = 200

p. 100). La connaissance du mécanisme de synthèse de ce dernier acide dans nos conditions expérimentales devrait apporter un élément précieux dans la compréhension du fonctionnement général du métabolisme anaérobie.

En l'absence d'inhibiteur, l'alanine peut être formée à partir du pyruvate par amination directe ou par transamination :

glutamate ou aspartate ⟶ alanine

En présence d'oxalate, l'éthanol subissant une baisse importante de radioactivité, il est vraisemblable que le pyruvate, précurseur commun de l'éthanol et de l'alanine, voit chuter, lui aussi, sa radioactivité. Dans cette hypothèse, il est difficile de justifier l'augmentation de radioactivité de l'alanine par le seul fonctionnement de la voie précédente.

Différentes explications peuvent être proposées à partir des données de la littérature.

1. JOLIVET (1969) a suggéré que l'α-alanine pouvait être synthétisé dans le tubercule de pomme de terre à partir de phosphoénolpyruvate lui-même formé par décarboxylation de l'acide oxaloacétique sous l'action d'une phosphoénol-pyruvate-carboxykinase (EC 4.1.1.32). Un tel système de production d'alanine par amination réductrice du phosphoénolpyruvate a été proposé dans le cas de *Chlorella pyrenoidosa* en photosynthèse (SMITH, BASSHAM et KIRK, 1961). Récemment, une phosphoénol-pyruvate - carboxykinase a été mise en évidence dans les baies de raisin de *Pinot noir* ; cette enzyme pourrait fonctionner après la véraison, dans le sens oxaloacétate -----> phosphoénolpyruvate (RUFFNER et KLIEVER, 1975).

2. Sous l'influence de l'inhibiteur oxalate, la voie malate -----> pyruvate étant partiellement bloquée, le malate-3-^{14}C va être préférentiellement dirigé vers d'autres voies non sensibles à l'oxalate. La théorie de la scission du cycle de Krebs en anaérobiose (NUÑEZ DE CASTRO *et al.*, 1974) offre deux possibilités d'interprétation :

2. 1. *Branche oxydative du cycle de Krebs.*

Le malate est oxydé en oxaloacétate dont une partie est associée à l'acétyl-CoA endogène pour former du citrate (augmentation de la quantité et de la radioactivité de ce dernier). Une autre fraction d'oxaloacétate pourrait conduire à l'alanine par double transamination. Mais, dans un tel système, l'alanine ne serait pas marquée (fig. 1).

2. 2. *Branche réductrice du cycle de Krebs.*

Le malate est réduit en fumarate lequel est partiellement aminé en aspartate. Ce couplage faisant intervenir fumarase et aspartase est très plausible car la réaction résultante est exergonique alors que la première séquence est endergonique (COSTES, 1972) :

$$COOH—CH_2—CHOH—COOH \xrightleftharpoons{\text{Fumarase}} COOH—CH{=}CH—COOH + H_2O$$
$$\Delta G_0 = +\ 700 \text{ cal à } 37^{\circ}C$$

$$COOH—CH{=}CH—COOH + NH_4^+ \xrightleftharpoons{\text{Aspartase}} COOH—CH_2—\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}—COOH + H^+$$
$$\Delta G_0 = —\ 3\ 720 \text{ cal à } 37^{\circ}C$$

Dans l'hypothèse ou la « fumarate réductase » (fumarate ⟶ succinate) est inhibée par l'oxalate, la formation d'aspartate pourrait alors être favorisée.

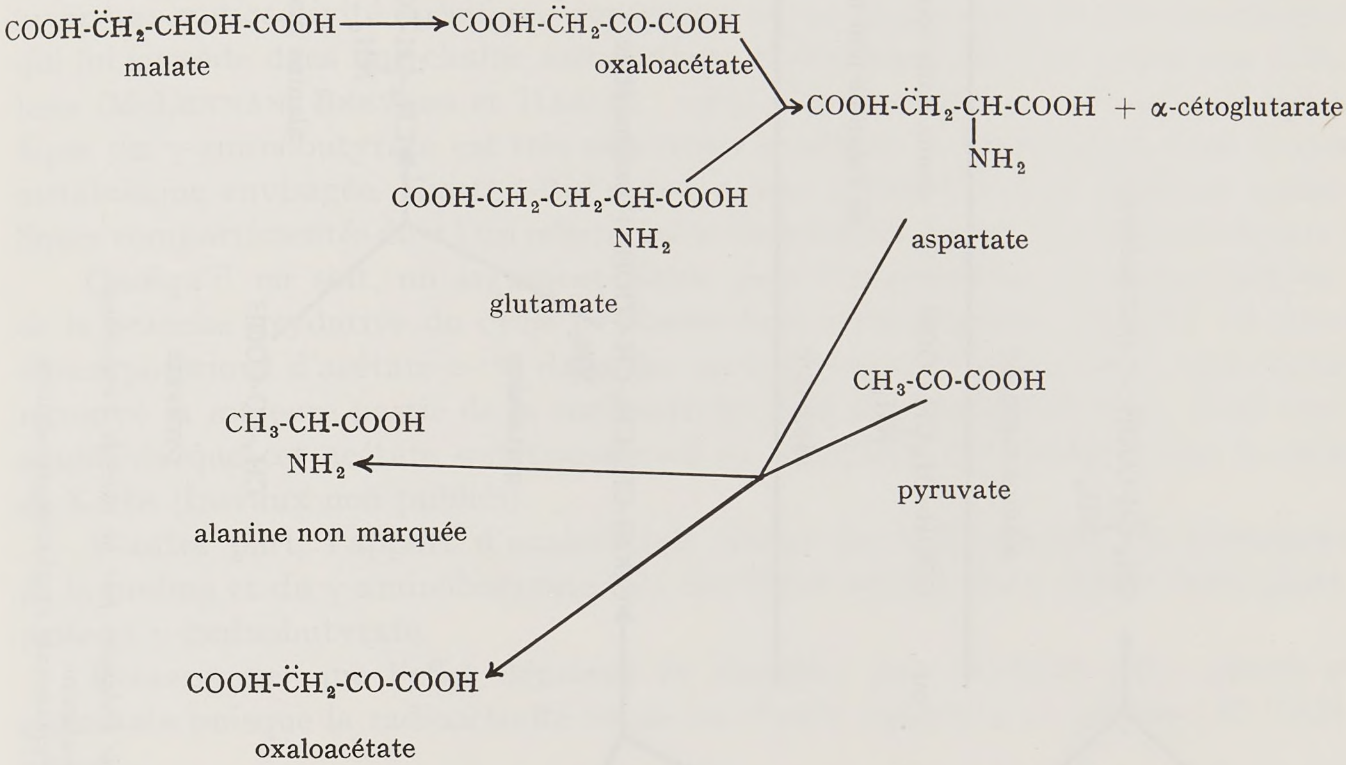


FIG. 1. — *Schéma hypothétique de formation de l'alanine par la voie de la « branche oxydative » du cycle de Krebs et double transamination*
C̈ = carbone radioactif ^{14}C

A partir de l'aspartate, la formation d'alanine marquée ou non marquée (étant donnée la structure symétrique du fumarate) serait obtenue par transamination directe aspartate-alanine (fig. 2 *a*) ou double transamination aspartate-glutamate et glutamate-alanine (fig. 2 *b*).

3. La formation d'alanine a été signalée au cours de l'anaérobiose de l'huître (HOCHACHKA et MUSTAFA, 1973). Un essai d'explication des phénomènes d'accumulation de lactate, pyruvate, alanine et succinate dans les cellules des tissus musculaires de vertébrés marins en plongée a été récemment avancé (HOCHACHKA *et al.*, 1975). En plongée, le muscle fermente d'une part les carbohydrates en lactate, d'autre part les acides aminés, aspartate et glutamate, en alanine et succinate. Selon les auteurs, les deux systèmes de réactions sont couplées énergétiquement. A partir de voies métaboliques sensiblement identiques, MCMANUS et JAMES (1975) ont pu établir les bilans de la glycolyse anaérobie des mollusques et des helminthes qui les parasitent.

Éventuellement, l'un (ou plusieurs) de ces schémas pourrait être adapté au métabolisme anaérobie de la baie de raisin.

Glutamate-γ-aminobutyrate-proline.

Comme nous l'avions déjà signalé, le γ-aminobutyrate présente de fortes radioactivités totales et radioactivités spécifiques (FLANZY, BURET et CHAMBROY, 1971). Cela se vérifie, à un degré moindre, pour la proline. Par quelles voies ces deux acides sont-ils synthétisés ?

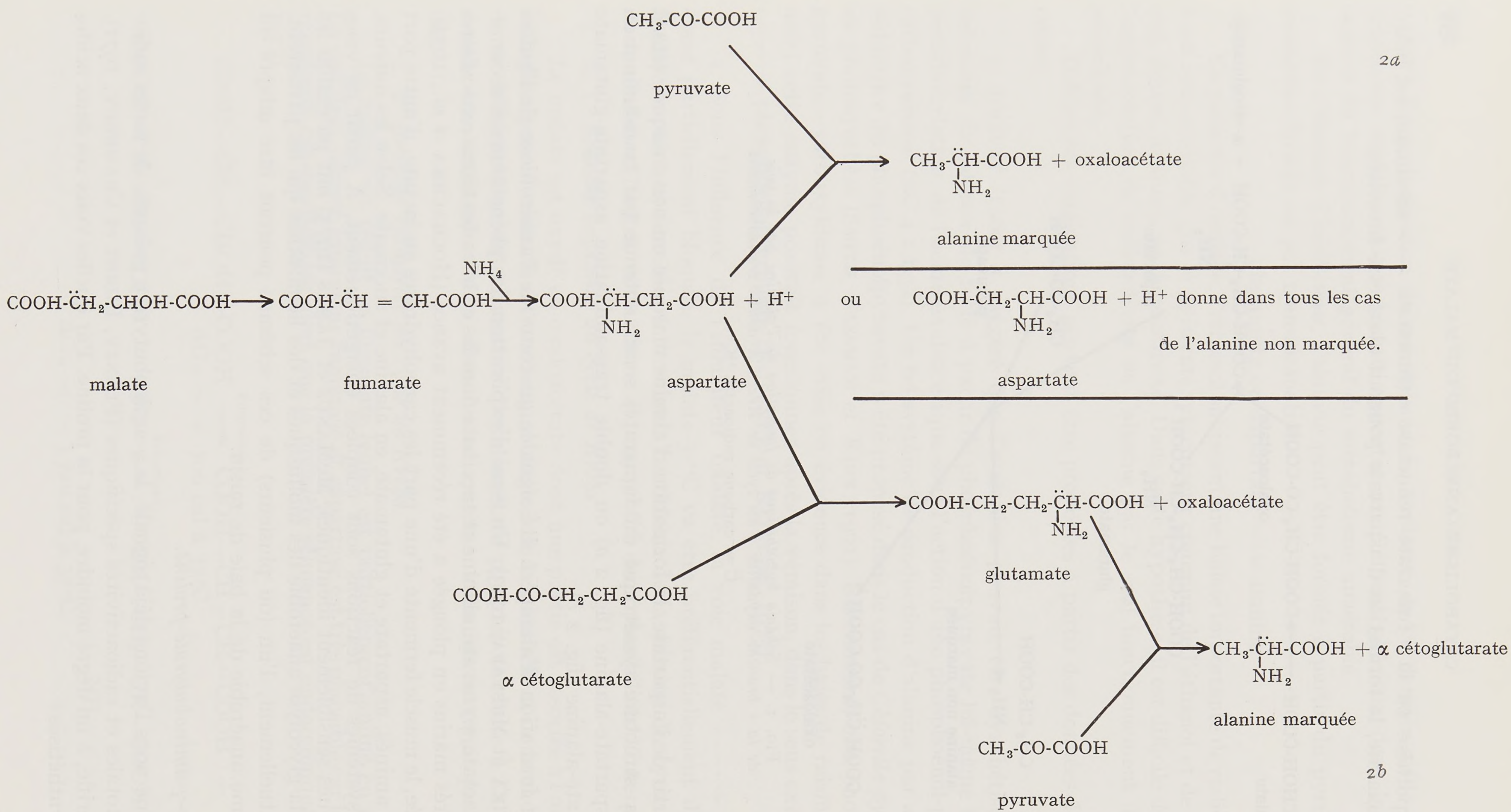


FIG. 2. — *Schéma hypothétique de formation de l'alanine par la voie de l'aspartase*

2a : transamination directe aspartate-alanine
2b : double transamination aspartate-glutamate et glutamate-alanine
C̈ = carbone radioactif ^{14}C.

Le passage à partir du malate par la branche oxydative du cycle de Krebs jusqu'à l'α-cétoglutarate et glutamate puis du glutamate à la proline ou au γ-aminobutyrate paraît acceptable. La décroissance des radioactivités spécifiques du citrate au glutamate et à la proline respecte la règle selon laquelle un précurseur direct doit avoir une radioactivité spécifique supérieure ou au moins égale à celle du substrat qui lui succède dans une chaîne métabolique se déroulant dans un même site cellulaire (McLennan, Beevers et Harley, 1963). En revanche, la radioactivité spécifique du γ-aminobutyrate est très supérieure à celle de ses précurseurs dans la voie métabolique envisagée. Existe-t-il d'autres voies? Existe-t-il deux systèmes anaboliques compartimentés dont l'un relierait plus directement malate et γ-aminobutyrate ?

Quoiqu'il en soit, un argument plaide pour l'intervention, au moins partielle, de la branche oxydative du cycle de Krebs dans cette synthèse. En effet, au cours d'incorporations d'acétate-2-^{14}C dans des raisins placés en anaérobiose, nous avons retrouvé la majeure partie de la radioactivité dans le γ-aminobutyrate ; il est vraisemblable que cet acétate soit transformé en acétylCoA puis intégré dans le cycle de Krebs (travaux non publiés).

D'autre part, l'apport d'oxalate fait chuter les radioactivités du glutamate, de la proline et du γ-aminobutyrate. Un lien étroit semble donc exister entre glutamate et γ-aminobutyrate.

Remarquons que l'effet dépressif de l'oxalate doit s'exercer entre citrate et glutamate puisque la radioactivité totale du citrate augmente en présence de l'inhibiteur.

L'accumulation de γ-aminobutyrate et de proline, dans des milieux à faibles concentrations d'oxygène, a déjà été notée (Ranson, 1953; Wickremasinghe, Swain et Goldstein, 1963 ; Duteurtre, Bourgeois et Chollot, 1971 ; travaux personnels non publiés). Ces acides correspondent-ils à des fins de voies métaboliques ou peuvent-ils jouer un rôle de précurseurs ? La diminution sensible de la radioactivité totale (45 p. 100) et de la radioactivité spécifique (62 p. 100) du γ-aminobutyrate entre le troisième et le septième jour d'anaérobiose alors que sa teneur croît, corrobore cette idée et l'hypothèse d'un compartimentage.

Un marquage du succinate et d'acides aminés à partir du γ-aminobutyrate-1-^{14}C a été signalé dans les tissu d'orge en germination et dans les carpophores d'*Agaricus bisporus* (Inatomi et Slaughter, 1971 ; Baldy et Latche, 1972). Dans les tissus d'orge, la diminution de la teneur en γ-aminobutyrate s'accompagne d'une augmentation de l'activité glutamatedécarboxylase.

Après incorporation d'acide γ-aminobutyrique-1-^{14}C dans des baies de raisin placées en anaérobiose, la radioactivité a été retrouvée principalement dans le malate et le glutamate ; un marquage net de l'acide succinique n'a pu être mis en évidence (travaux non publiés). Au cours du métabolisme anaérobie, le γ-aminobutyrate pourrait donc être catabolisé. Des résultats analogues ont été obtenus par Jolivet (1969) dans les tubercules de pommes de terre traités par la Rindite.

Relation malate ⟶ autres acides organiques

Shikimique-glycérique.

Les radioactivités totales et spécifiques de ce groupe d'acides croissent régulièrement pour atteindre des valeurs importantes au septième jour. Les radioactivités

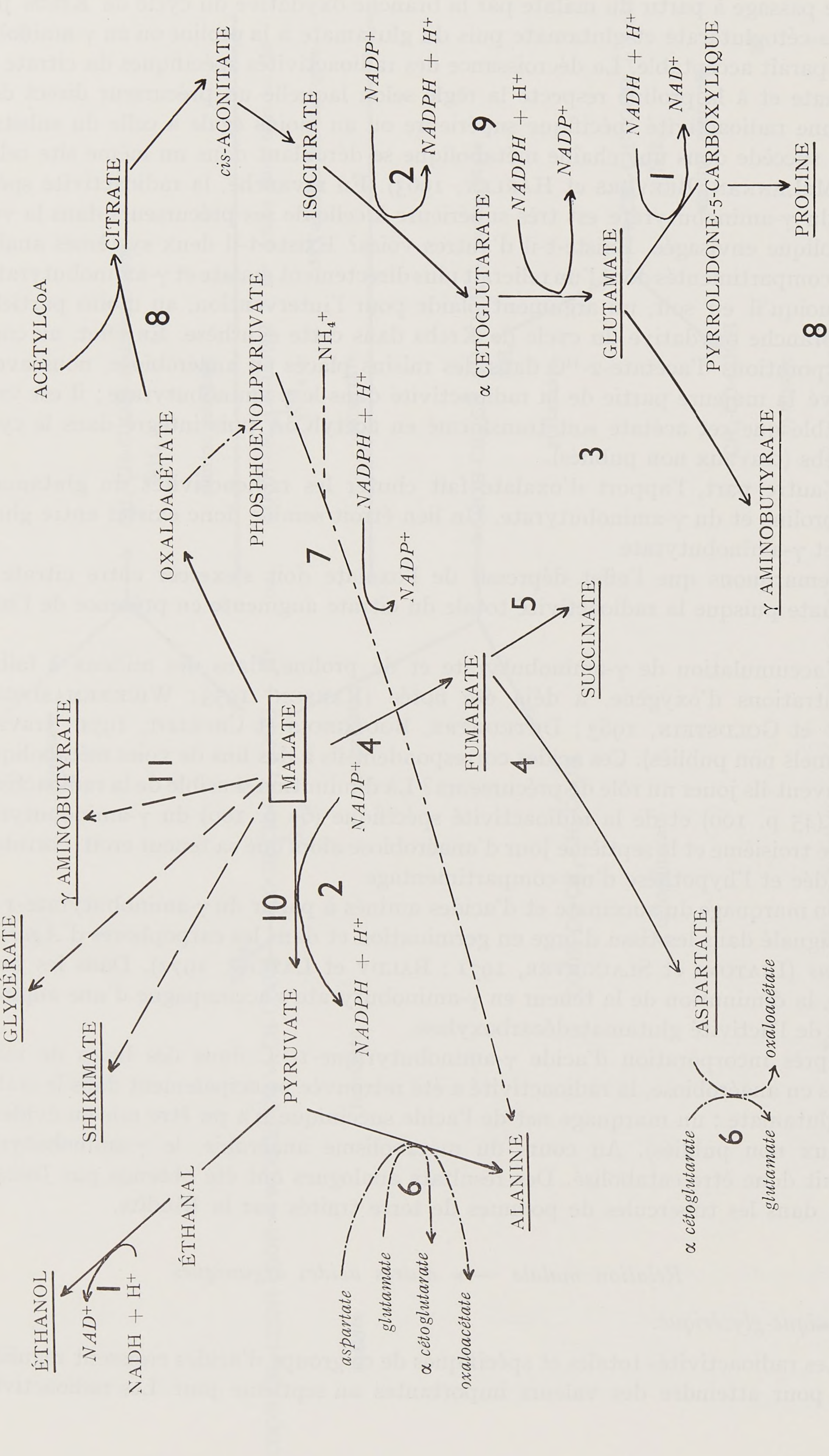

ÉTHANOL
NAD+
NADH + H+
1
ÉTHANAL
GLYCÉRATE
SHIKIMATE
γ AMINOBUTYRATE
11
MALATE
10
2
NADPH + H+
NADP+
PYRUVATE
aspartate
glutamate
α cétoglutarate
oxaloacétate
6
ALANINE
OXALOACÉTATE
PHOSPHOENOLPYRUVATE
7
NADPH + H+
NADP+
NH4+
ACÉTYLCoA
8
CITRATE
cis-ACONITATE
ISOCITRATE
NADP+
2
NADPH + H+
α CÉTOGLUTARATE
9
NADPH + H+
NADP+
GLUTAMATE
3
γ AMINOBUTYRATE
4
FUMARATE
4
5
SUCCINATE
ASPARTATE
α cétoglutarate
glutamate
6
oxaloacétate
NADH + H+
1
NAD+
PYRROLIDONE-5-CARBOXYLIQUE
8
PROLINE

FIG. 3.

retrouvées chutent lorsque les lots sont mis en présence d'oxalate. Ces résultats confirment nos conclusions antérieures sur l'éventualité d'une filiation malate-shikimate (FLANZY, BURET et CHAMBROY, 1971). Ils relancent l'intérêt d'une étude sur les voies de formation de ces acides dont certains peuvent être des précurseurs de composés aromatiques (JOURET, MOUTOUNET et DUBOIS, 1972).

Tartrique.

La radioactivité retrouvée dans le tartrate est négligeable compte tenu de la forte concentration de cet acide dans les baies.

Compartimentage du malate

Entre le troisième et le septième jour du métabolisme anaérobie, la quantité de malate décroît (51 p. 100) ainsi que sa radioactivité totale (34 p. 100). En revanche, sa radioactivité spécifique augmente (34 p. 100). De tels résultats montrent que non seulement le malate est catabolisé durant la période considérée, mais aussi que le malate endogène est proportionnellement plus utilisé que le malate radioactif. Comme nous l'avions déjà signalé, ce fait peut traduire une localisation cellulaire différente des deux types de malate (FLANZY, 1971).

CONCLUSIONS

La radioactivité du malate-3-^{14}C incorporé dans des baies de raisin placées en anaérobiose se retrouve principalement dans l'éthanol, l'aminobutyrate, le γ-ensemble « glycérate-shikimate », le succinate. Il est vraisemblable que le fumarate, l'aspartate et le glutamate présentent des vitesses importantes d'utilisation et de renouvellement.

L'enzyme malique intervient dans la première séquence d'une voie conduisant du malate à l'éthanol.

FIG. 3. — *Hypothèses sur quelques voies du catabolisme du malate au cours du métabolisme anaérobie des baies de raisin*

1.-2. En anaérobiose, nécessité de disposer de NAD^+ pour obtenir une glycolyse active. Deux solutions sont proposées :
 1. activation des systèmes où $NADH + H^+$ - - - - - - -→ NAD^+
 2. remplacement des systèmes à NAD^+ par des systèmes à $NADP^+$

3. En anaérobiose, inhibition de l'α-cétoglutaratedéshydrogénase. Scission du cycle de Krebs en deux branches.
4. Couplage fumarase-aspartase.
5. Fumarate réductase permettant le passage du fumarate au succinate. Inhibition présumée par l'oxalate.
6. Possibilité de formation d'alanine par transamination à partir de l'aspartate.
7. Possibilité de formation d'alanine par amination réductrice du phosphoénolpyruvate.
8. « Branche oxydative » du cycle de Krebs conduisant à la formation de γ-aminobutyrate et de proline. Inhibition présumée par l'oxalate entre le citrate et le glutamate.
9. Couplage isocitratedéshydrogénase NADP-glutamatedéshydrogénase NADPH.
10. Inhibition par l'oxalate de l'enzyme malique (EC 1.1.1.40). Diminution de la synthèse d'éthanol à partir du malate.
11. Voie directe problématique.

Les noms soulignés correspondent aux substrats dosés au cours de cet essai

——————→ voies probables.
– – – – –→ voies possibles.
— — — —→ voies actives non explorées.

La synthèse d'alanine semble favorisée par la présence d'acide oxalique. Ce dernier pourrait inhiber, indépendamment de l'enzyme malique, une fumarate-réductase et une enzyme située sur la branche oxydative du cycle de Krebs, entre le citrate et le glutamate.

Les activités des voies conduisant au γ-aminobutyrate d'une part, au glycérate et shikimate d'autre part, paraissent importantes et elles varient au cours du temps.

Ces résultats associés à ceux obtenus antérieurement ainsi qu'à des données bibliographiques nous conduisent à proposer un schéma d'utilisation de l'acide malique durant le métabolisme anaérobie du raisin (fig. 3).

Reçu pour publication en mars 1976.

REMERCIEMENTS

Le personnel du Laboratoire du Métabolisme intermédiaire (I.N.R.A. Versailles) a réalisé certains contrôles analytiques sur nos échantillons. Nous l'en remercions vivement.

Nous exprimons d'autre part notre gratitude à MM. DUCET et JOLIVET pour les fructueux conseils qu'ils nous ont dispensés au cours de ce travail.

SUMMARY

PROCESSES OF MALATE CATABOLISM DURING THE ANAEROBIC METABOLISM OF GRAPE BERRIES

In order to precise malate fate during the anaerobic metabolism of grape, malate-3-$^{i'}$ = 3 was injected into *Carignan* berries kept in darkness at 35°C under carbon dioxide atmosphere. The injection of labelled malate was effected in presence or not of non-labelled oxalate which inhibits malic enzyme (EC 1.1.1.40).

The analyses of the samples fixed after 3 and 7 days anaerobiosis concerned the titration of various substrates, organic acids, amino-acids and glycolysis products, and the measuring of the $NADP^+$-malic enzyme (EC 1.1.1.40) and malate dehydrogenase (EC 1.1.1.40).

Radioactivity is mainly observed in ethanol, amino-butyrate the non-separated group glycerate-shikimate and succinate. Malic enzyme acts in the first sequence of a process leading from malate to ethanol. Alanin synthesis seems to be stimulated in presence of oxalate.

The results obtained and some hypotheses presented in the literature induce us to suggest a utilization scheme for malate in the anaerobic metabolism of grape.

RESUMEN

VÍAS DEL CATABOLISMO DEL MALATO DURANTE EL TRANSCURSO DEL METABOLISMO ANAEROBIO DE LAS BAYAS DE LA UVA

Con objeto de precisar la transformación del malato durante el transcurso del metabolismo anaerobio de la uva, se ha inyectado malado-3-^{14}C en las bayas de *Carignan* dispuestas en la oscuridad, a 35°C, en una atmósfera de gas carbónico. La inyección del malato marcado ha sido efectuada en presenci o en ausencia de oxalato no marcado, inhibidor del enzima málico (EC 1.1.1.40).

Los análisis de las muestras fijadas tras 3 y 7 días de anaerobiosis se han referido a la dosificación de substratos variados, ácidos orgánicos, ácidos aminos, productos de la glicólisis, así como también a la medición de las actividades del enzima málico-NADP- (EC 1.1.1.40) y de la malatodehidrogenasa (EC 1.1.1.37).

La radiactividad se encuentra principalmente en el etanol, el aminobutirato, el conjunto no separado glicerato-shikimato, y el succinato. El enzima málico interviene en la primera secuencia de una vía que conduce del malato al etanol. La síntesis de alanina parece favorecida por la presencia de oxalato.

Los resultados obtenidos y ciertas hipótesis propuestas en la literatura conduce a su vez a proponer un esquema de utilización del malato durante el metabolismo anaerobio de la uva.

RIASSUNTO

VIE DI CATABOLISMO DEL MALATO DURANTE IL METABOLISMO ANAEROBICO DELLE BACCHE D'UVA

Allo scopo di precisare il processo che segue il malato durante il metabolismo anaerobico dell'uva, è stato iniettato del malato-3-^{14}C in alcune bacche di *Carignan* poste in ambiente scuro, a 35°C, in un'atmosfera di gas carbonico.

L'iniezione del malato marcato è stata fatta in presenza o in assenza di ossalato non marcato, inibitore dell'enzima malico (EC 1.1.1.40).

Le analisi dei campioni fissati dopo 3 e 7 giorni di anaerobiosi hanno avuto come oggetto il dosaggio di sottostrati variati, acidi organisi, aminoacidi, prodotti della glicolisi e la misura delle attività dell'enzima malico-NADP+ (EC 1.1.1.40) e della malatodeidrogenasi (EC 1.1.1.37).

La radioattività si ritrova principalmente nell' etanolo, nell' γ-ammino-butirato, nell'insieme non separato glicerato-shikimate e nel succinato. L'enzima malico interviene nella prima sequenza di un processo che porta dal malato all'etanolo. La sintesi d'alanina sembra favorita dalla presenza d'ossalato,

I risultati ottenuti e alcune ipotesi avanzate nella letteratura sul soggetto portano a proporre uno schema d'impiego del malato durante il metabolismo anaerobico dell'uva.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMARASINGHAM Ch. R., DAVIS B. D., 1965. Regulation of α-ketoglutarate dehydrogenase formation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **240**, 3664-3667.

BALDY P., LATCHE J.-C., 1972. Étude du métabolisme de l'acide γ-aminobutyrique dans les carpophores d'*Agaricus bisporus* Lge : incorporation d'acide γ-aminobutyrique-1-^{14}C. *C.R.Ac. Sci.*, **275**, 2123-2126.

BENDALL D. S., RANSON S. L., WALKER D. A., 1960. Effects of carbon dioxide on the oxidation of succinate and reduced diphosphopyridine nucleotide by *Ricinus* mitochondria. *Bioch. J.*, **76**, 221-225.

COSTES C., 1972. *Éléments de biochimie structurale*. 203. Chaire Chim. Biol. I.N.A. Paris-Grignon.

DENNY F. E., 1945. Synergistic effects of three chemicals in the treatment of dormant potato tubers to hasten germination. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **14**, 1-14.

DUTEURTRE B., BOURGEOIS C., CHOLLOT B., 1971. Study of the assimilation of proline by brewing yeasts. *J. Inst. Brewing*, **77**, 28-35.

FLANZY C., ANDRÉ P., FLANZY M., CHAMBROY Y., 1967. Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. *a*) Influence de la température. *b*) Influence de la durée d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **16**, *a*) 27-34; *b*) 89-107.

FLANZY C., FLANZY M., ANDRÉ P., CHAMBROY Y., 1968. Fixation à l'obscurité du $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin, en anaérobiose. *Ann. Technol. agri.*, **17**, 287-297.

FLANZY C., FLANZY M., ANDRÉ P., CHAMBROY Y., 1969. Fixation à l'obscurité du $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin, en anaérobiose. II. Devenir du ^{14}C au cours de la fermentation intracellulaire. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 307-325.

FLANZY C., BURET M., CHAMBROY Y., 1971. Fixation à l'obscurité d'acide malique-3-^{14}C par des baies de raisin placées en anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 49-60.

FLANZY C., 1971. Recherches sur certaines voies métaboliques impliquées dans la fermentation intracellulaire des baies de raisin. in « *C. R. des Journées Macération Carbonique* » 10-11/2/1971 Techno. Montfavet, 69-83.

FLANZY C., ANDRÉ P., BENARD P., BURET M., CHAMBROY Y., JOURET C., 1974. Fermentation intracellulaire des baies de raisin au cours de leur métabolisme anaérobie. *Ann. Technol. agric.*, **23**, 481-500.

FOWLER M. W., 1973. Metabolism of (2-^{14}C) acetate to amino acids and proteins in segments of bean seedling roots. *Planta*, **112**, 235-242.

FRENKEL R., 1972. Isolation and properties of a cytosol and a mitochondrial malic enzyme from bovine brain. *Archiv. Bioch. biophys.*, **152** 136-143.

GARCIA P., BURET M., CHAMBROY Y., FLANZY C., 1974. Évolution de la l-malate : NADP oxydo-réductase (EC 1.1.1.40) au cours du métabolisme anaérobie des baies de raisin. *C. R. Acad. Agric.*, 20/11/1974, 1193-1198.

GARCIA P., 1975. *Contribution à l'étude de l'« enzyme malique » du raisin l-malate : NADP oxydoréductase (decarboxylating) EC* 1.1 .1.40. Thèse. 3^{e} cycle. Univ. Sciences et Techniques Languedoc. Montpellier.

HARTMAN R. E., KEEN N. T., 1973. Enzymes catalysing anaplerotic carbon dioxide fixation in *Verticillium albo-atrum*. *Phytopathol.*, **63**, 947-953.

HOCHACHKA P. W., MUSTAFA T., 1973. Enzymes in facultative anaerobiosis of molluscs. I. Malic enzyme of oyster adductor muscle. 625-637. II. Basic catalytic properties of PEPcarboxykinase in oyster adductor muscle. 639-655. III. PEPcarboxykinase and its role in aerobic-anaerobic transition. 657-667. *Comp. Bioch. Physiol.*, **45** B.

HOCHACHKA P. W., OWEN T. G., ALLEN J. F., WHITTOW G. C., 1975. Multiple end products of anaerobiosis in diving vertebrates. *Comp. Bioch. Physiol.*, **50** B, 17-22.

HÖLL W., 1974. Dark CO_2 fixation by cell-free preparations of the wood of *Robinia pseudoacacia*. *J. Canad. Bota.*, **52**, 727-734.

INATOMI K., SLAUGHTER J. C., 1971. The role of glutamate decarboxylase and γ-aminobutyric acid in germination barley. *J. Exp. Bot.*, **22**, 561-571.

JOLIVET E., 1969. *Métabolismes des acides organiques et des acides aminés libres chez le tubercule de pomme de terre (Solanum Tuberosum* L.) *au cours de la cessation spontanée de son repos végétatif et au cours de la rupture provoquée de son repos par la rindite.* Thèse. État. Université de Paris-Orsay.

JOURET C., MOUTOUNET M., DUBOIS P., 1972. Formation du vinyl benzène lors de la fermentation alcoolique du raisin. *Ann. Technol. agric.*, **21**, 69-72.

LUPIAÑEZ J. A., MACHADO A., NUÑEZ DE CASTRO I., MAYOR F., 1974. Succinic acid production by yeasts grown under different hypoxic conditions. *Molecul. Cellul. Bioch.*, **3**, 113-116.

MCLENNAN D. H., BEEVERS H., HARLEY J. L., 1963. « Compartimentation » of acids in plant tissues. *Biochem. J.*, **89**, 316-327.

MACHADO A., NUÑEZ DE CASTRO I., MAYOR F., 1974. Isocitrates dehydrogenases and oxoglutarate dehydrogenase activities of bakers yeast grown in a variety of hypoxic conditions. *Departamento de Bioquim. Biol. Molecular. Univ. Canto Blanco.* Madrid.

MCMANUS D. P., JAMES B. L., 1975. Anaerobic glucose metabolism in the digestive gland of *Littorina Saxatilis Rudis* (Maton) and in the daughter sporocysts of *Microphallus similis* (JÄG) (Digenea : Microphallidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, **51** B, 293-297.

MARR J. J., 1973. Regulation of aerobic fermentation in protozoans. II. Allosteric inhibition of the malic enzyme. *Comp. Bioch. Physiol.*, **44** B, 701-710.

MOROT-GAUDRY J. F., NICOL M. Z., JOLIVET E., 1973. Détermination quantitative des acides organiques dans les extraits végétaux. Amélioration de la technique d'analyse par chromatographie de partage sur colonne de gel de silice. *J. Chromatog.*, **87**, 425-432.

MUKERJI S. K., TING I. P., 1968. Localisation intracellulaire des enzymes du métabolisme du CO_2 dans les phylloclades du Cactus. *Phytochem.*, **7**, 903.

NUÑEZ DE CASTRO I., ARIAS SAAVEDRA J. M., MACHADO A., MAYOR F., 1974. Effects of inhibitors of mitochondrial protein synthesis on the NADH and NADPH glutamate dehydrogenases in yeast. *Molecul. Cellul. Bioch.*, **3**, 109-111.

RANSON S. L., 1953. Zymase et métabolisme des acides chez les plantes supérieures. *Nature*, **172**, 252.

ROUX L., LESAINT C., 1959. Mise au point d'une technique de détermination des acides organiques chez les végétaux. *Ann. Physiol. vég.*, **1**, 83-92.

RUFFNER H. P., KLIEVER W. M., 1975. Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in grape berries. *Plant. Physiol.*, **56**, 67-71.

SAÏTO T., TOMITA K., 1973. Two types of soluble malic enzyme in rat tissues. *J. Biochem.*, **73**, 803-810.

SMITH D. C., BASSHAM J. A., KIRK M., 1961. Dynamics of the photosynthesis of carbon compounds. II. Aminoacids synthesis. *B.B.A.*, **48**, 299-313.

TING I. P., SHERMAN I. W., DUGGER W. M., 1966. Intracellular location and possible function of malic dehydrogenase isozymes from young maize root tissue. *Plant. Physiol.*, **41**, 1083-1084.

WICKREMASINGHE R. L., SWAIN T., GOLDSTEIN J. L., 1963. Accumulation of aminoacids in plant cell tissue cultures. *Nature*, **199**, 1302-1303.

WILLIAMS M. W., PATTERSON M. E., 1964. Nonvolatile organic acids and core breakdown of *Bartlett* pears. *Agric. Food Chem.*, **12**, 80-83.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (2), 143-158.

QUELQUES ASPECTS DU COMPORTEMENT MÉCANIQUE DE PROTÉINES DE TOURNESOL FILÉES. INFLUENCE DE DIVERS ADJUVANTS ET LIANTS SIMPLES

M. LAROCHE et P. SALÉ

Station de Recherches sur la Viande,
Centre de Recherches de Clermont Ferrand, I. N. R. A.,
Theix Saint Genès Champanelle,
63110 Beaumont

RÉSUMÉ

On a appliqué, pour l'étude de la texture de protéines de tournesol filées, les méthodes utilisées pour l'évaluation de la tendreté de la viande. Après avoir défini les caractéristiques mécaniques de ces produits, on a envisagé la modification de leurs propriétés par des adjuvants et leur réorganisation avec des liants simples. Les fibres obtenues à partir de protéines de tournesol pures présentent une résistance trop élevée pour que le produit soit accepté par le consommateur. Parmi les adjuvants utilisés, le saindoux amène une diminution importante de la résistance. En ce qui concerne les liants, l'utilisation d'ovalbumine tend à augmenter la résistance alors que celle des gélatines la diminue de façon importante. Il est possible, par un choix judicieux d'adjuvants et de liants, d'obtenir un produit de caractéristiques mécaniques comparables à celles de la viande bouillie.

Mots clés : *tournesol, protéines végétales, alimentation, adjuvants.*

INTRODUCTION

Les protéines végétales destinées à l'alimentation humaine peuvent être produites sous diverses formes, en poudres, extrudées ou filées (LEFEBVRE, 1971). Les poudres et extrudats représentent des sources de protéines bon marché mais qui ne présentent, au point de vue organoleptique, aucune propriété positive ; aussi leur utilisation se limite à l'addition, dans des produits transformés, à des taux suffisamment bas pour ne pas être perçu par le consommateur (LACOURT, 1973).

Ces protéines sont donc utilisées avant tout comme substituts à des protéines plus nobles. Au contraire, les protéines filées possèdent, à côté d'une pureté élevée nécessaire à leur filage, une structure qui peut être la base d'aliments nouveaux

dont elles constitueront la phase protéique principale. De tels aliments ont été réalisés sous forme d' « analogues », tels les analogues de jambon et de filet de poulet fabriqués aux États-Unis. D'une façon générale, ces produits peuvent prétendre se substituer, au moins partiellement, à leurs homologues naturels dans la mesure où, pour un coût moindre, ils présenteront une qualité acceptable. Leur réalisation suppose que l'on puisse donner aux protéines filées les caractéristiques qui font la qualité organoleptique d'un aliment : odeur, saveur, couleur et texture. C'est ce dernier point qui est envisagé ici.

Il n'est pas douteux que de nombreuses études ont été développées sur ce sujet, principalement par les firmes qui produisent ou peuvent produire ces analogues. Mais ces études ne sont connues que de façon parcellaire, essentiellement par le biais de brevets (BOYER, SAEWERT, 1956 ; KIELSON, 1965) qui ne donnent évidemment pas les principes généraux de cette restructuration. Tous ces travaux portent essentiellement sur les protéines extraites du soja.

Dans le cadre d'une action concertée de la D.G.R.S.T. entre divers laboratoires de l'I.N.R.A. et de la Société Rhône-Poulenc, des protéines végétales ont été extraites de tourteaux de tournesol et filées. Pour notre part, nous avons étudié le comportement mécanique de ces fibres en vue de la reconstitution d'une texture viande. Cette texture fait intervenir deux types de propriétés. D'abord les propriétés des fibres elles-mêmes ; ces propriétés peuvent être modifiées par l'addition d'adjuvants au collodion avant filage, soit pour introduire des éléments nécessaires au goût et à la couleur, soit pour en modifier la consistance. Ensuite les fibres brutes seront nécessairement réorganisées en des structures de dimensions croissantes, telles que mèches, groupes de mèches..., qui permettront de donner la forme désirée et la tenue mécanique nécessaire aux préparations culinaires et aux manipulations, ainsi que certaines des caractéristiques recherchées pour la texture. Cette réorganisation fera appel à des liants de nature variée qui vont intervenir par leur résistance propre et par modification des relations interfibrillaires.

Nous avons d'abord étudié le comportement mécanique de fibres fabriquées avec des protéines de tournesol, soit pures, soit additionnées d'adjuvants ; nous avons ensuite structuré ces fibres avec divers liants et comparé leur comportement à celui de viande bouillie.

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — *Les fibres*

Les fibres de protéines végétales que nous avons utilisées ont été préparées à partir de protéines de tournesol extraites et purifiées par la Station de Biochimie et de Physicochimie des Céréales (Massy). Le filage a été effectué par la Société Rhône-Poulenc (Centre de Recherches des Carrières, 69, Saint-Fons). La filière utilisée comportait 745 trous de 0,15 mm de diamètre. L'ensemble des fils est rassemblé en une « mèche » qui en fin de fabrication présente la forme d'un ruban d'environ 7 à 10 mm de large, dans lequel le diamètre moyen des fils est d'environ 0, 1 mm.

Après fabrication, les mèches ont été congelés à — 20°C et conservées dans cet état jusqu'à utilisation. La décongélation a été effectuée à + 4°C en sachet étanche.

Pour faire varier les propriétés mécaniques des fibres, leur composition a été modifiée par addition de saindoux et de gluten. La composition des divers lots de fibres que nous avons étudiés est indiquée ci-dessous :

A : protéine de tournesol pure : 100 p. 100 ;
B : protéine de tournesol pure : 90,9 p. 100, gluten 9,1 p. 100 ;

C : protéine de tournesol pure : 77 p. 100, saindoux 23 p. 100 ;
D : protéine de tournesol pure : 62,5 p. 100, saindoux 31,25 p. 100, gluten 6,25 p. 100 ;
E : promine D pure : 77 p. 100, saindoux 23 p. 100 (La composition E a été obtenue à partir de protéines de soja du commerce).

2. — *Les enrobés*

Les fibres destinées à l'enrobage sont rincées à l'eau distillée puis égouttées par centrifugation à 50 *g*. Elles sont ensuite plongées dans la solution de liant, essorées à la main et placées dans des moules donnant des échantillons de 1 cm² de section et 15 cm de long.

Deux liants ont été utilisés, la gélatine et l'ovalbumine. Ils étaient préparés dans des solutions à 3 p. 100 de NaCl. Les solutions de gélatine à 5 p. 100 ont été préparées à partir de gélatine de force variable : 80, 150 et 240 Blooms. Les fibres étaient plongées dans la solution à 50°C puis mises à refroidir à + 4°C dans les moules. Les échantillons avec l'ovalbumine ont été préparés dans des solutions à 8 p. 100, mis en moules, puis chauffés à 80 ou 95°C pendant 1 heure.

Nous avons également préparé des échantillons avec la solution à 3 p. 100 de NaCl dans les conditions de traitement thermique correspondant aux préparations avec les liants.

3. — *Méthodes d'étude des propriétés mécaniques*

Les fibres protéiques, à l'état brut et après enrobage, ont été soumises à deux types de test mécanique à l'aide des dispositifs que nous utilisons normalement pour l'étude des propriétés mécaniques des viandes.

a) *Test de cisaillement.*

Le cisaillement est effectué entre une lame et deux couteaux (fig. 1 *a*) sur une largeur de 10 mm et une épaisseur, e_0, pouvant varier entre 1 et 12 mm selon le nombre de mèches utilisées. La vitesse de cisaillement est constante et égale à 1,3 mm/sec. Les valeurs de l'épaisseur initiale et du maximum de la force sont automatiquement perforées sur un ruban de papier et le diagramme force/déplacement est enregistré.

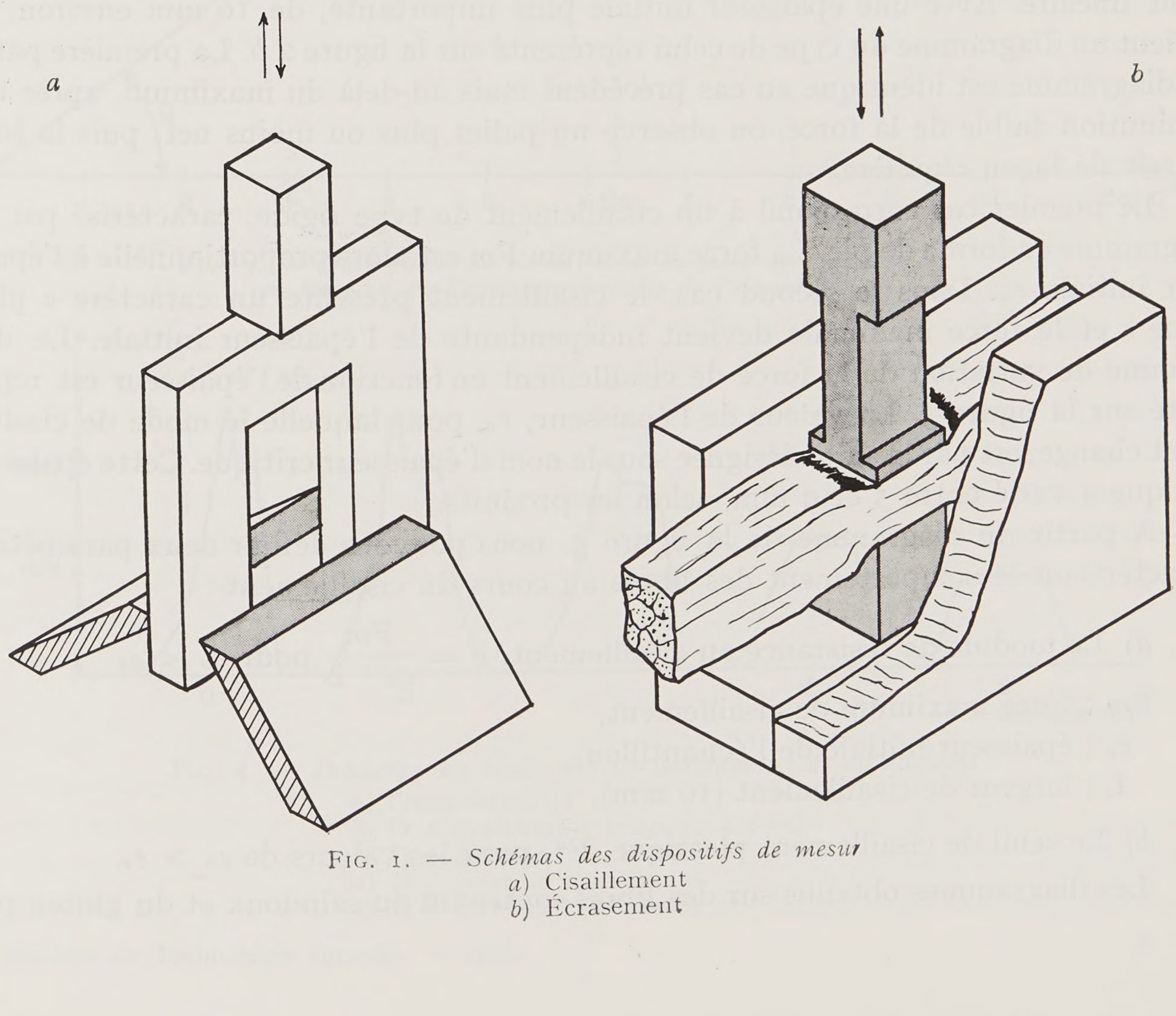


Fig. 1. — *Schémas des dispositifs de mesur*
a) Cisaillement
b) Écrasement

b) *Test d'écrasement.*

L'échantillon présente les mêmes caractéristiques géométriques que pour le cisaillement. L'écrasement est effectué entre deux poinçons horizontaux (fig. 1 *b*) de section carrée, de 10 mm de côté, placés entre deux guides verticaux. L'échantillon est disposé de telle sorte que ses fibres soient parallèles au plan des guides. La vitesse de déformation est constante et égale à 1 mm/s. Un dispositif inverse automatiquement le mouvement du poinçon mobile lorsque la distance entre les deux poinçons est réduite à une fraction prédéterminée de l'épaisseur initiale, e_0, de l'échantillon. Celle-ci est déterminée automatiquement alors que l'échantillon n'est soumis qu'au seul poids du poinçon supérieur, soit 200 g. Une centrale d'acquisition de données et de calculs connectée aux capteurs de force et de déplacement permet la mesure de la force pour des déformations croissantes de 10 p. 100 en 10 p. 100, et la détermination des coordonnées du premier maximum (C) de la force (fig. 5 *a*). Enfin un enregistreur XY permet le tracé des diagrammes force/déplacement.

Toutes les mesures mécaniques ont été effectuées à la température ambiante, entre 18 et 22°C.

II. — COMPORTEMENT MÉCANIQUES DES FIBRES NUES ET ENROBÉES

1. — *Comportement au cours du cisaillement*

La figure 2 *a* représente l'allure typique d'un diagramme de cisaillement de fibre de tournesol pur, pour une épaisseur initiale relativement faible (inférieure à 5 mm). Plusieurs phases apparaissent caractérisées sur ce diagramme : le tassement initial ($\alpha\beta$) suivi d'une phase de déformation par compression ($\beta\gamma$) au cours de laquelle la force croît de façon proportionnelle à l'épaisseur jusqu'à une valeur maximum, F*m*. La force décroît ensuite jusqu'à une valeur nulle de façon pratiquement linéaire. Avec une épaisseur initiale plus importante, de 10 mm environ, on obtient un diagramme du type de celui représenté sur la figure 2 *b*. La première partie du diagramme est identique au cas précédent mais au-delà du maximum, après une diminution faible de la force, on observe un palier plus ou moins net, puis la force décroît de façon régulière.

Le premier cas correspond à un cisaillement de type rigide, caractérisé par un diagramme en forme de pic. La force maximum F*m* est alors proportionnelle à l'épaisseur initiale e_0. Dans le second cas, le cisaillement présente un caractère « plastique » et la force maximale devient indépendante de l'épaisseur initiale. Le diagramme de variation de la force de cisaillement en fonction de l'épaisseur est représenté sur la figure 3. La valeur de l'épaisseur, e_c, pour laquelle le mode de cisaillement change, est par la suite désignée sous le nom d'épaisseur critique. Cette épaisseur critique a varié entre 5 et 9 mm, selon les produits.

A partir du diagramme de la figure 3, nous pouvons définir deux paramètres, caractérisant le comportement des fibres au cours du cisaillement :

a) Le module de résistance au cisaillement, $g = \dfrac{Fm}{e_o \cdot L}$ pour $e_o < e_c$

F*m* : force maximum de cisaillement,
e_o : épaisseur initiale de l'échantillon,
L : largeur de cisaillement (10 mm).

b) Le seuil de cisaillement plastique, F*, pour les valeurs de $e_o > e_c$.

Les diagrammes obtenus sur des fibres contenant du saindoux et du gluten pre-

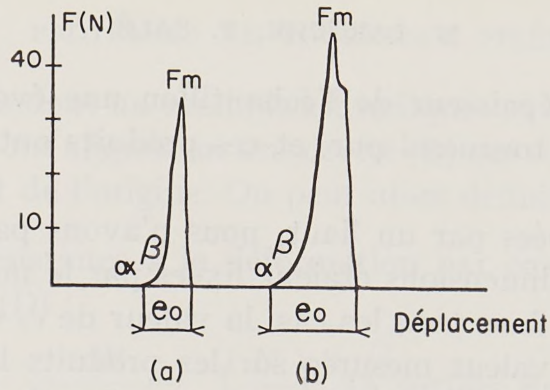


FIG. 2. — *Diagrammes de cisaillement de fibres de protéines de tournesol*

a) $e_o < e_c$
b) $e_o > e_c$

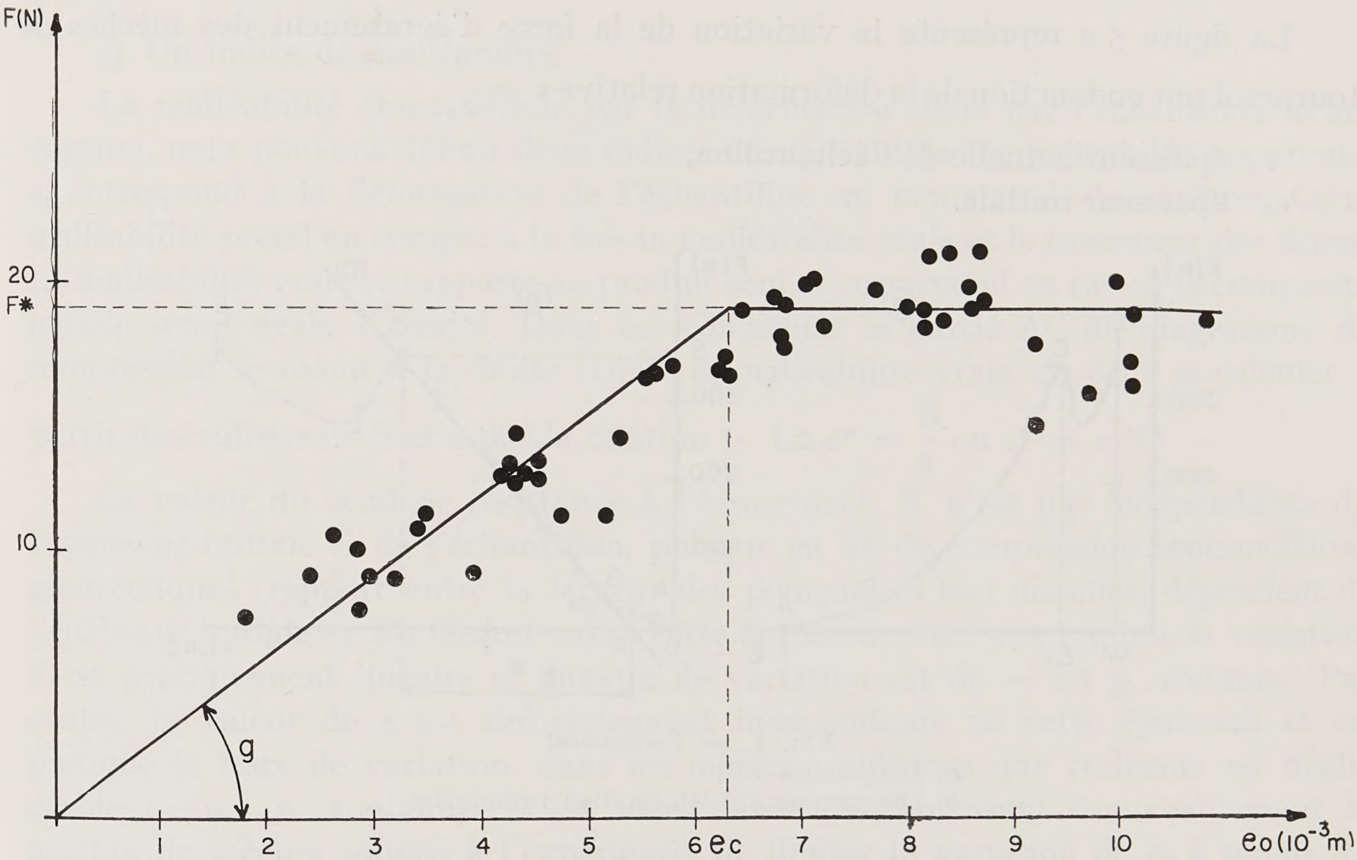


FIG. 3. — *Diagramme de variation de la force de cisaillement en fonction de l'épaisseur initiale de l'échantillon*

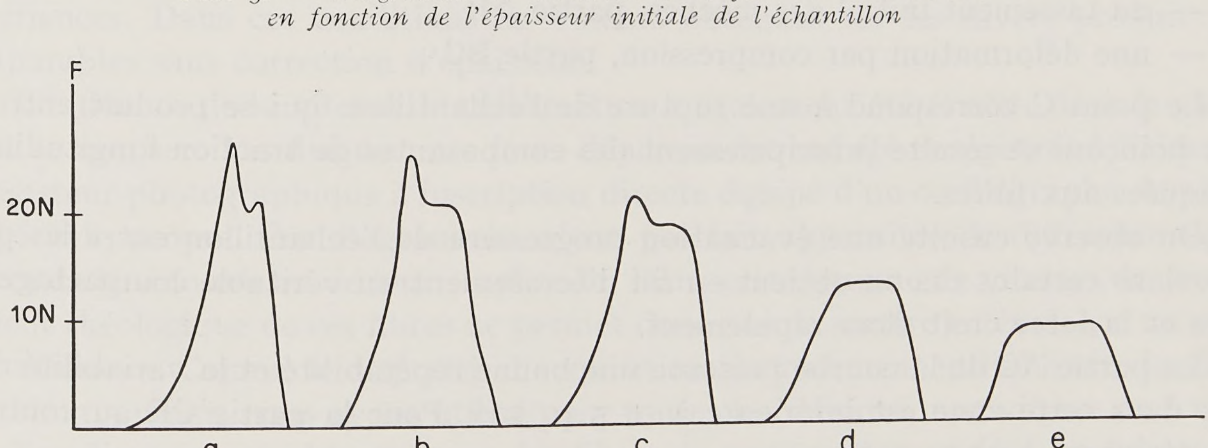


FIG. 4. — *Influence des liants sur les diagrammes de cisaillement*

a) Composition D
b) D + ovalbumine coagulée à 80°C
c) D + gélatine 80 Blooms
d) D + gélatine 150 Blooms
e) D + gélatine 240 Blooms

sentent en fonction de l'épaisseur de l'échantillon une évolution analogue à celle observée sur les fibres de tournesol pur, et ces produits ont été caractérisés par les mêmes paramètres.

Pour les fibres enrobées par un liant, nous n'avons pas fait varier l'épaisseur de l'échantillon dont les dimensions étaient fixées par le moule. Mais l'examen des diagrammes montre que, dans tous les cas, la valeur de e_c était inférieure à celle de l'échantillon (fig. 4). La valeur mesurée sur les produits liés est donc le seuil de cisaillement plastique F*.

2. — *Comportement au cours de l'écrasement*

La figure 5 *a* représente la variation de la force d'écrasement des mèches de tournesol pur en fonction de la déformation relative $\varepsilon = \frac{e}{e_0}$

e : épaisseur actuelle de l'échantillon,
e_0 : épaisseur initiale.

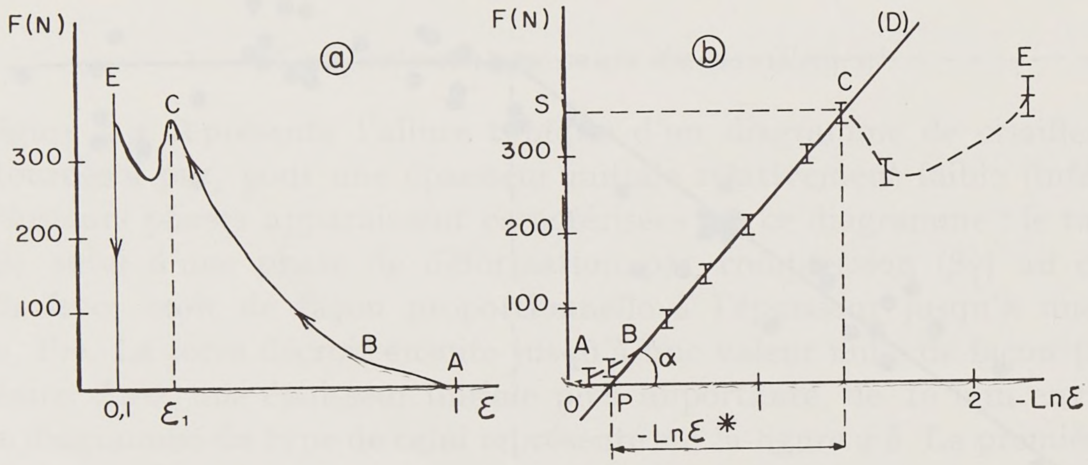


FIG. 5. — *Écrasement*
a) Diagramme réel
b) Diagramme en déformation rationnelle

On observe successivement les phases suivantes :

— un tassement initial des mèches, partie AB

— une déformation par compression, partie BC

Le point C correspond à une rupture de l'échantillon, qui se produit entre les deux poinçons et résulte principalement des composantes de traction longitudinales appliquées aux fibres.

On observe ensuite une évacuation progressive de l'échantillon entre les poinçons, dans certains cas on obtient en fin d'écrasement un véritable compactage des fibres et la force croît alors rapidement.

La partie AC de la courbe présente une bonne répétabilité et la variabilité de la force dans cette zone est inférieure à ± 5 p. 100. Pour la partie CE au contraire elle atteint 20 à 25 p. 100.

Pour chaque type de fibre étudié, on a répété l'expérience sur 10 échantillons et on a relevé les valeurs de F correspondant aux neuf valeurs de ε décroissant de 1 à 0,1 par valeur de 0,1. A partir de ces valeurs, on définit un diagramme de déformation type, obtenu en portant en ordonnée les valeurs moyennes des dix mesures et en abscisse la déformation rationnelle : $\varepsilon' = - \text{Ln}\, \varepsilon$.

Sur ces diagrammes dont un exemple est indiqué sur la fig. 5 *b*, les points correspondant à la partie BC sont alignés sur une droite (D) qui coupe l'axe des déformations en un point P, différent de l'origine. On peut alors définir les paramètres suivants :

a) le module de résistance à la déformation par compression α, proportionnel à la pente de la droite (D) :

$$\alpha = \frac{1}{A} \frac{dF}{d(-\text{Ln}\ \varepsilon)} \quad \left(\frac{N}{cm^2}\right) \quad \text{(A surface du poinçon)}$$

b) le seuil de résistance à l'écrasement, égal au premier maximum « S » de la force d'écrasement.

c) Un indice de malléabilité.

La malléabilité étant définie par la déformation subie par l'échantillon avant rupture, nous pouvons définir deux indices de malléabilité : la malléabilité apparente, ε_1 correspond à la déformation de l'échantillon au moment de la rupture. Cette malléabilité prend en compte à la fois la malléabilité vraie et le tassement des fibres. La malléabilité vraie se rapporte au produit seul et correspond au cas où la compacité initiale serait égale à l'unité. Dans ces conditions la partie AC du diagramme de compression se réduit à la droite (D) et la malléabilité vraie ε^*, peut se calculer à partir des valeurs de S et α par la relation $-\text{Ln}\ \varepsilon^* = \frac{S}{\alpha}$ ou $\varepsilon^* = e^{-S/\alpha}$

La valeur du seuil de résistance à l'écrasement, S, n'est pas indépendante de l'épaisseur initiale e_0 de l'échantillon, puisque en fin de compression les conditions géométriques (rapport entre la largeur des poinçons et leur distance) dépendent de l'épaisseur initiale e_0. En faisant varier cette épaisseur entre 5 et 1,5 mm, la variation S est pratiquement linéaire et le taux de variation est de — 2,5 p. 100/mm. Par contre, la valeur de α est théoriquement indépendante de cette épaisseur et en pratique le taux de variation, dans les mêmes conditions que ci-dessus est négligeable (— 0,2 p. 100/mm). Il est assez facile en choisissant convenablement le nombre de mèches soumis à l'expérience, de limiter la variation de e_0 à moins de 1 mm de part et d'autre d'une valeur moyenne qui a été de 13 mm au cours de nos expériences. Dans ces conditions les valeurs obtenues sur les divers produits sont comparables sans correction d'épaisseur.

L'influence de la vitesse de déformation a également été étudiée dans la gamme 0,1 à 10 mm/sec. Les diagrammes force-déplacement ont été enregistrés à l'aide d'un enregisteur photographique à inscription directe équipé d'un oscillographe de 300 Hz de période propre. Ces diagrammes n'ont pas fait apparaître de différence significative de leur forme ou de leur amplitude. Dans cette gamme de vitesses, le comportement rhéologique de ces fibres ne permet donc pas de mettre en évidence un caractère visqueux. Comme le dispositif d'acquisition normalement utilisé limite la vitesse à environ 3 mm/s, nous avons utilisé pour toutes les mesures, une vitesse de 1 mm/s.

Les diagrammes obtenus avec des fibres de composition variées, ou après enrobage avec l'ovalbumine, n'ont pas présenté de modifications profondes par rapport à ceux de tournesol pur (fig. 6). Au contraire dans le cas des produits enrobés avec des gélatines de force élevée, 150 et 240 Blooms, la partie initiale des diagrammes est fortement modifiée. La phase de tassement initial disparaît et le début de la déformation fait apparaître une résistance élevée puis, après la première rupture, la force

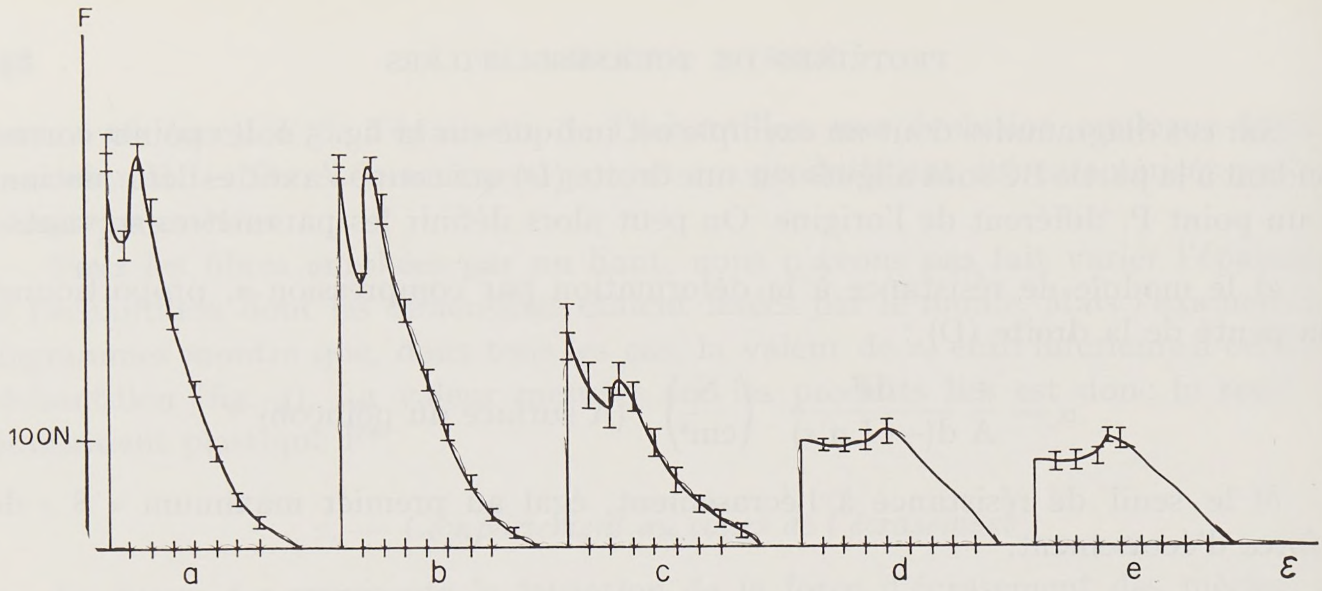


Fig. 6. — *Influence des liants sur les diagrammes d'écrasement*

a) Composition A
b) A + ovalbumine coagulée à 80°C
c) A + gélatine 80 Blooms
d) A + gélatine 150 Blooms
c) A + gélatine 240 Blooms

TABLEAU I

Paramètres de cisaillement

Composition	g (N/m²)	F* (N)
A	46×10^4	36 ± 5
B	54×10^4	42 ± 5
C	33×10^4	24 ± 2
D	28×10^4	18 ± 2
E	41×10^4	28 ± 3

TABLEAU 2

Force de cisaillement des protéines enrobées (en newton)

Composition	O_1	O_2	g_1	g_2	g_3
A	$45 \pm 0,9$	53 ± 3	39 ± 2	31 ± 3	$19 \pm 2,5$
B	30 ± 1	53 ± 1	23 ± 1	$21 \pm 1,5$	$17 \pm 1,5$
C	$31 \pm 0,6$	$33 \pm 1,5$	$28 \pm 0,8$	$22 \pm 1,5$	$14 \pm 1,1$
D	$19 \pm 0,6$	$27 \pm 1,5$	$15 \pm 0,5$	$12 \pm 1,5$	$8 \pm 0,6$
E	30 ± 2	$35 \pm 1,5$	$25 \pm 1,5$	$16 \pm 0,7$	$12 \pm 0,3$

O_1 : Ovalbumine coagulée à 80°C.
O_2 : Ovalbumine coagulée à 95°C
g_1 : Gélatine 80 Blooms.
g_2 : Gélatine 150 Blooms.
g_3 : Gélatine 240 blooms.

reste pratiquement constante jusqu'à la fin de l'écrasement. Les diagrammes types sont alors composés de deux droites, ce qui correspond à la déformation simple successivement de deux corps, le pemier correspondant aux fibres plus liants, sans déplacement important du liant par rapport aux fibres, le second correspond aux déformations avec mouvement relatif important du liant par rapport aux fibres.

Dans ce cas les paramètres que nous avons pris en considération sont ceux définis à partir de la deuxième partie de compression (droite D) de la fig. 5.

Enfin pour les enrobages effectués avec de la gélatine de faible force, 80 Blooms, la partie initiale des diagrammes montre encore un léger tassement, résultat de la faible consistance de ce liant.

III. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. — *Résultats*

Les valeurs du module de résistance au cisaillement, *g*, et du seuil de cisaillement plastique F*, sont indiquées sur le tableau 1 pour les fibres des diverses compositions indiquées plus haut. Les valeurs de F* obtenues sur les divers enrobages sont indiquées sur le tableau 2.

Les résultats obtenus en écrasement, ont été présentés sur les diagrammes de coordonnées (S, α) de la figure 7. Chaque diagramme correspond à une composition des fibres et chaque traitement à un symbole particulier indiqué en légende. On remarquera que sur ces diagrammes, les droites passant par l'origine correspondent à des valeurs constantes de l'indice de malléabilité vraie.

La tableau 3 donne les valeurs de F* mesurées sur les fibres ayant subi le même traitement thermique que pour la préparation des enrobages. Les résultats des mesures correspondantes en écrasement sont indiqués sur les diagrammes de la figure 7. Enfin les valeurs de S et α obtenues sur les liants coagulés à l'état pur sont données dans le tableau 4.

Pour tous les résultats, l'unité de force est le newton, celle de longueur le mètre.

B. — *Discussion*

Les produits filés sont relativement coûteux, à cause du traitement complexe que représente le filage proprement dit, et parce qu'ils nécessitent au départ une matière première de haute pureté. Ils ne pourront être revalorisés que s'ils arrivent à se substituer à certains produis carnés. En ce qui concerne les propriétés qui nous intéressent ici, c'est-à-dire celles liées à la texture du produit, il est pratique de les situer par rapport à celles des viandes.

La figure 8 représente des diagrammes types de cisaillement et d'écrasement de viandes de bovin crues et cuites. Dans le muscle cru, la structure peut schématiquement être réduite à celle d'un milieu à deux phases, l'une dispersée, les myofibrilles qui représentent l'essentiel de la masse, l'autre continue, regroupant l'ensemble des tissus assurant la liaison entre les myofibrilles, (le tissu conjonctif) qui ne représentent que quelques pour cent de la totalité du tissu musculaire. Cette fraction repré-

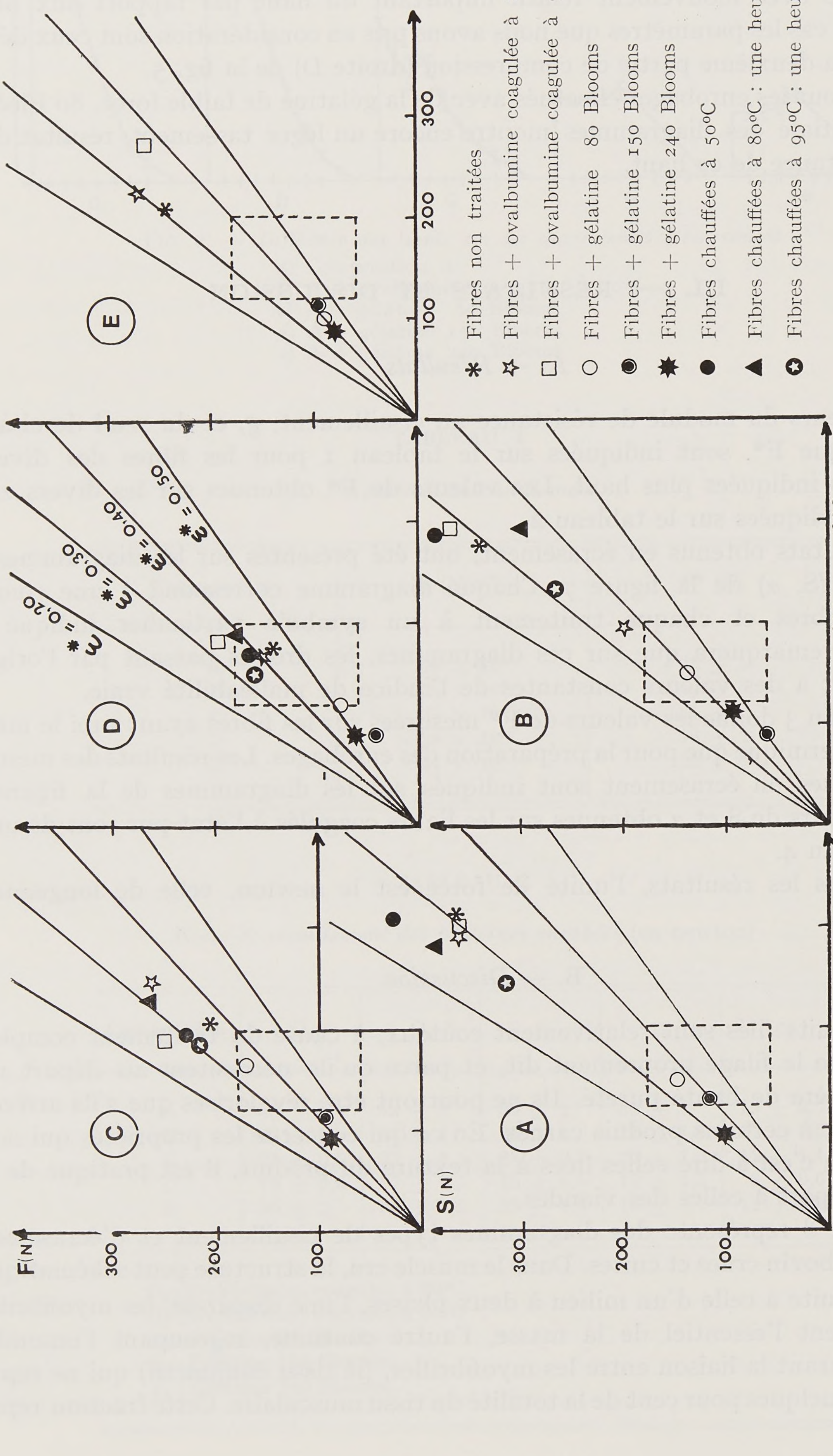


FIG. 7. — *Influence des liants sur les paramètres d'écrasement.*
Les rectangles pointillés correspondent aux valeurs obtenues avec la viande bouillie

TABLEAU 3

*Influence des traitements thermiques sur la force de cisaillement F**

Composition	T O_1	T O_2	T g
A	44 ± 1,5	36 ± 1,5	46 ± 1,2
B	36 ± 1,7	35 ± 1,3	42 ± 1,3
C	30 ± 1,5	29 ± 0,8	30 ± 0,6
D	21 ± 0,7	21 ± 0,8	23 ± 1

T O_1 : 1 heure à 80°C.
T O_2 : 1 heure à 95°C.
T_g : Immersion à 50°C.

TABLEAU 4

Caractéristiques des liants

	S(N)	α(N/m²)
Ovalbumine coagulée à 80°C	0,003	$< 10^2$
Ovalbumine coagulée à 95°C	0,21	7×10^4
Gélatine 80 Blooms	0,19	8×10^4
Gélatine 150 Blooms	0,44	15×10^4
Gélatine 240 Blooms	0,69	16×10^4

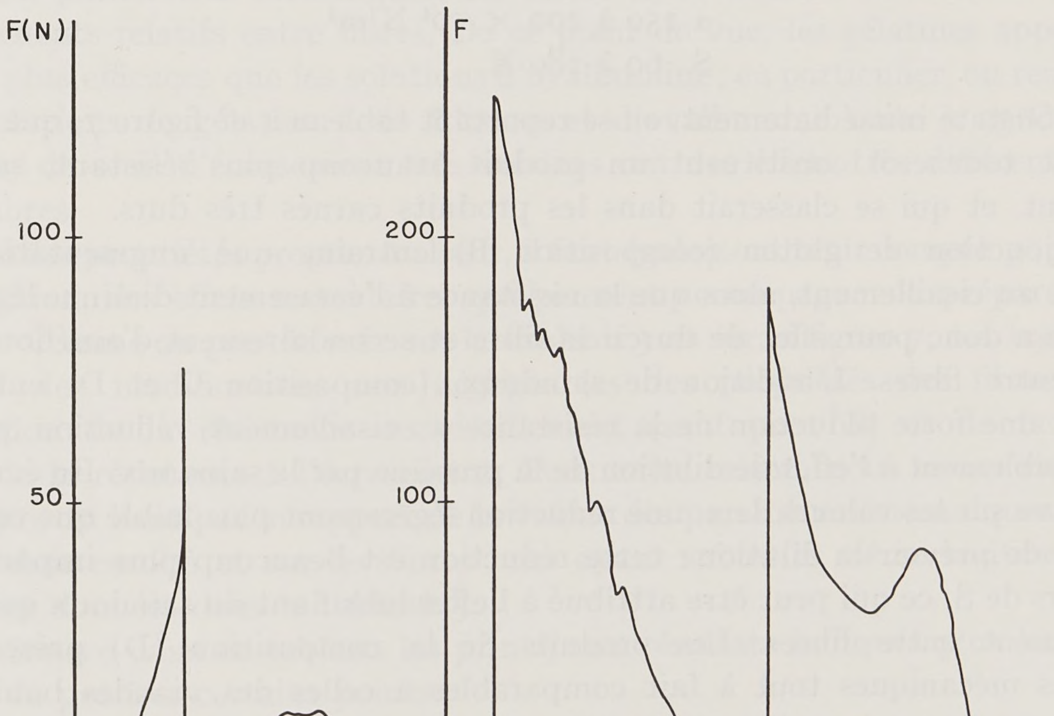


FIG. 8. — *Diagrammes de muscle* Pectoralis profundus *de bovin*

a) Cisaillement muscle cru
b) Cisaillement après chauffage, quatre heures à 97°C
c) Écrasement muscle cru
d) Écrasement après chauffage, quatre heures à 97°C

sente cependant un elément déterminant du comportement mécanique du muscle : plus cette phase est importante, plus le muscle est résistant et dur. La cuisson par voie humide entraîne des modifications de comportement au niveau des myofibrilles qui sont coagulées et qui en quelque sorte durcissent alors que les tissus conjonctifs sont plus ou moins solubilisés et désorganisés. Il y a donc une variation de l'importance relative des deux phases dans la résistance mécanique.

Les expériences de cisaillement permettent principalement de caractériser la résistance du milieu conjonctif (SALE et TOURAILLE, 1973) et d'évaluer également à partir de caractéristiques géométriques des diagrammes, le stade de maturation (SALE, 1971). Les expériences d'écrasement fournissent des informations complémentaires sur l'état des myofibrilles notamment dans le cas des viandes cuites.

1. *Fibres nues.*

Il apparaît immédiatement par la comparaison des diagrammes que le comportement mécanique des produits que nous avons étudiés, qu'il s'agisse de fibres brutes ou enrobées, est toujours très différent de celui des muscles crus. En effet, dans les produits fibreux, contrairement à ce que nous avons vu pour le muscle cru, il n'existe pas de liaisons structurées entre les fibres. Par contre, on remarque une grande similitude entre les diagrammes obtenus sur produits fibreux et sur les viandes bouillies pour lesquelles les liaisons entre fibres ont été rompues par la cuisson. Si l'allure des diagrammes de viande cuite est assez homogène, l'amplitude de ces diagrammes peut varier notablement. Dans le cas du muscle *Pectoralis profundus,* classiquement utilisé en bouilli (4 h d'ébullition), les valeurs des différents paramètres varient, selon que la viande est tendre ou dure, comme indiqué ci-après :

F^* 10 à 30 N
α 150 à 200 $\times$ 10^4 N/m^2
S 60 à 180 N

On constate immédiatement, en se reportant tableau 1 et figure 7, que les fibres brutes de tournesol constituent un produit beaucoup plus résistant, surtout en écrasement, et qui se classerait dans les produits carnés très durs.

L'adjonction de gluten (composition B) entraîne une augmentation de la résistance au cisaillement, alors que la résistance à l'écrasement diminue légèrement. Le gluten a donc pour effet de durcir la fibre et secondairement d'améliorer le glissement entre fibres. L'addition de saindoux, (composition C et D) entraîne au contraire une forte réduction de la résistance au cisaillement, réduction qui correspond sensiblement à l'effet de dilution de la protéine par le saindoux. En écrasement, on retrouve sur les valeurs de α, une réduction légèrement plus faible que ce que permettrait de prévoir la dilution ; cette réduction est beaucoup plus importante sur les valeurs de S, ce qui peut être attribué à l'effet lubrifiant du saindoux qui favorise le glissement entre fibres. Les produits de la composition (D) présentent des propriétés mécaniques tout à fait comparables à celles des viandes bouillies.

2. *Effet des liants.*

Nous avons indiqué plus haut que les diagrammes obtenus sur des produits liés avec l'ovalbumine étaient du même type que ceux obtenus sur fibres brutes. La figure 7 montre que les produits enrobés à l'ovalbumine et cuits à 95°C présentent des propriétés pratiquement identiques à celles de la fibre de départ pour le tourne-

sol pur, et une augmentation faible du seuil d'écrasement, S, pour les autres fibres, la valeur de α n'étant que peu modifiée. De même les forces de cisaillement présentent une augmentation de 30 à 50 p. 100 selon les fibres. D'une façon générale, les produits ainsi traités ont donc subi un durcissement.

Au contraire, avec les produits enrobés avec de la gélatine, on observe dans tous les cas une réduction, en général considérable, de la résistance à l'écrasement et une réduction également importante, de la force de cisaillement dans les cas des enrobages effectués avec des gélatines de force 240 et 150 Blooms. En particulier l'enrobage de la composition C avec de la gélatine de force 240 Blooms conduit à un produit de résistance très inférieure à celle d'une viande bouillie.

D'une façon plus générale, il apparaît que les liants permettent de modifier, dans une large gamme, les propriétés des produits à base de fibres et la combinaison des choix du liant et de la composition des fibres permet d'envisager de réaliser des produits de texture très variée. Dans cette optique il est intéressant de préciser le mode d'action de ces liants. Ils peuvent agir d'une part en tant que phase continue de dispersion, d'autre part en tant qu'agent lubrifiant modifiant les relations mécaniques entre fibres.

L'examen du tableau 4, qui indique les caractéristiques de compression mesurées sur les liants seuls, montre que leur résistance propre est toujours très inférieure à celle des fibres pures. Pour les gélatines, les valeurs du seuil sont proportionnelles à l'indice Bloom. Cette résistance des liants n'intervient donc que pour des efforts faibles, ceux mis en cause dans la tenue du produit lors des manipulations, et au cours des déformations de faible amplitude dans la première phase des tests mécaniques. Pour les déformations de grandes amplitudes pratiquées au cours des mesures des paramètres mécaniques. les liants interviennent surtout en facilitant les mouvements relatifs entre fibres. De ce point de vue, les gélatines apparaissent beaucoup plus efficaces que les solutions d'ovalbumine ; en particulier, on remarquera que les solutions de gélatine à 80 Blooms et d'ovalbumine cuite à 95°C qui ont des valeurs de seuil d'écrasement très voisines ont des effets très différents sur les diverses fibres.

A côté des propriétés propres du liant, il faut également tenir compte pour apprécier son action, des effets secondaires qui peuvent accompagner la préparation des enrobages. Comme on peut le voir sur le tableau 3 et sur la figure 7, ces traitements entraînent des modifications non négligeables des propriétés des fibres brutes, augmentation de la résistance au cisaillement (sauf pour B) et de façon plus variable, de la résistance à l'écrasement. Pour cette raison, nous avons caractérisé l'effet propre du liant par le rapport de la valeur des paramètres mécaniques mesurés sur le produit enrobé et sur les fibres nues ayant subies le même traitement. Ces valeurs sont données dans le tableau 5.

On retrouve dans ce tableau les principaux résultats indiqués plus haut, mais il permet de préciser certains points.

Sur les paramètres d'écrasement, la réduction de la valeur du seuil est toujours plus forte que celle de α. La malléabilité du produit enrobé est donc plus faible que celle du produit brut.

L'efficacité propre telle qu'elle est définie varie beaucoup selon la résistance des fibres utilisées et d'une façon générale cette efficacité croît avec la résistance des fibres enrobées.

Enfin, la comparaison des paramètres mécaniques obtenus pour les compositions C et E, qui en diffèrent que par la nature de la protéine montre que si les fibres à base de soja présentent une force de cisaillement plus élevée, donc une plus grande rigidité, cette différence est largement masquée par l'effet du liant dans les produits enrobés à la gélatine.

TABLEAU 5

Influence propre des liants

Composition		O_1	O_2	g_1	g_2	g_3
A	S	0,93	1,12	0,37	0,27	0,25
	α	1,04	1,21	0,48	0,43	0,31
	F*	1,02	1,50	0,85	0,67	0,42
B	S	0,68	1,41	0,37	0,16	0,25
	α	0,69	1,25	0,53	0,31	0,40
	F*	0,85	1,55	0,56	0,49	0,40
C	S	0,94	1,17	0,75	0,43	0,41
	α	1,07	1,03	0,86	0,58	0,49
	F*	1,02	1,15	0,91	0,72	0,45
D	S	0,83	1,22	0,52	0,28	0,36
	α	0,88	1,21	0,72	0,52	0,56
	F*	0,89	1,25	0,68	0,52	0,34

(Voir définition des symboles tableau 2).

CONCLUSION

Les résultats précédents montrent que par un choix judicieux des adjuvants entrant dans la composition des fibres et des liants utilisés pour les structurer, il est possible d'obtenir des produits présentant une résistance et un comportement mécanique très variés. Certains de ces produits présentant une grande analogie, du point de vue de ce comportement mécanique, avec les viandes cuites, il apparaît que c'est par l'imitation de ce type de viande que la mise au point d'un substitut serait le plus simple. Divers points devront cependant être précisés et en premier lieu il conviendra de déterminer grâce aux analyses d'un jury de dégustateurs entraînés, quels sont les caractères propres de la texture des produits filés, ce qui permettra de préciser si les paramètres mécaniques que nous avons pris en compte dans cette étude, jouent un rôle comparable à celui qu'ils jouent dans le cas des viandes.

En second lieu, l'ensemble de ces résultats a été acquis sur des fibres filées à partir d'un même lot de protéines, un des premiers à permettre un filage techniquement

satisfaisant. Il conviendra d'apprécier les conséquences sur les propriétés mécaniques, des variations qui peuvent apparaître au niveau de la matière première, de l'extraction de la protéine, et du filage.

Enfin, le problème des liants et des adjuvants doit être reconsidéré dans le contexte général non seulement de la texture, mais aussi de la couleur et surtout du goût et de l'arôme et en tenant compte des traitements thermiques que devra subir le produit fini.

Reçu pour publication en avril 1976.

SUMMARY

MECHANICAL BEHAVIOUR OF SPUN SUNFLOWER PROTEINS EFFECT OF ADJUVANTS AND BINDING MATERIALS

Within the framework of a study on the use of textured vegetal proteins of sunflower, supported by the D.G.R.S.T., we have studied the mechanical behaviour of spun proteins with and without binding materials.

Fibers, joined together in bundles, were prepared from pure proteins, and from mixture of protein and adjuvants such as gluten and lard (pig backfat). Bundles were bound with solutions of gelatin or ovalbumin.

The mechanical properties of theses products were tested with the same apparatus we used for raw and cooked meat *i.e.* shearing and crushing devices.

The analysis of force/deformation diagrams leads to the definition and the signification of the parameters used for describing the mechanical properties of these products.

The mechanical behaviour of the different products we studied was quite similar with these of beef muscles (*Pectoralis profundus*) cooked in boiling water during 4 hours.

Products with very different textural properties, ranging from very soft to very tough can be obtained by changing the nature of adjuvants added to the protein before spinning, and the characteristics of materials used to bind fibres and bundles.

RESUMEN

ALGUNOS ASPECTOS RELATIVOS AL COMPORTAMIENTO MECANICO DE LAS PROTEINAS DE GIRASOL HILADAS INFLUENCIA DE LOS DIVERSOS COADYUVANTES Y AGLOMERANTES SIMPLES

Para el estudio de la textura de las proteinas de girasol hiladas, se han aplicado los mismos métodos que se utilizan para la evaluación de la ternura de la carne. Tras haber definido las características mecánicas de estos productos, se ha vislumbrado la modificación de sus propiedades por medio de coadyuvantes y su reorganización mediante aglomerantes simples. Las fibras obtenidas por medio de proteinas de girasol en estado puro presentan una resistencia demasiado elevada para que el producto pueda ser aceptado por el consumidor. Entre los coadyuvantes utilizados, la manteca de cerdo introduce una disminución de la resistencia importante.

Por lo que respecta a los aglomerantes, la utilización de ovalbumina tiende a aumentar la resistencia, mientras que por otra parte, la utilización de gelatinas disminuye esta resistencia de forma importante. Por una selección adecuada de coadyuvantes y aglomerantes, existe la posibilidad de obtener un producto de características mecánicas comparables a las de la carne cocida.

RIASSUNTO

ALCUNI ASPETTI DEL COMPORTAMENTO MECCANICO DI PROTEINE DI GIRASOLE FILATE INFLUENZA DI VARI COADIUVANTI E LEGANTI SEMPLICI

Per lo studio della tessitura di proteine di girasole filate, sono stati applicati i metodi normalmente impiegati per la valutazione della tenerezza della carne. Dopo aver definito le caratteristiche meccaniche di questi prodotti, si è pensato di modificare le loro proprietà tramite coadiuvanti è di riorganizzarli mediante leganti semplici.

Le fibre ottenute a partire da proteine pure di girasole presentano una resistenza troppo elevata perchè il prodotto possa essere accettato dal consumatore.

Tra i coadiuvanti impiegati è lo strutto che provoca una rilevante diminuzione della resistenza.

Per quanto riguarda i leganti, l'ovalbumina fa aumentare la resistenza mentre le gelatine la diminuiscono considerevolmente. Se si fanno scelta giudiziosa di coadiuvanti e di leganti, è possibile ottenere un prodotto avente delle caratteristiche meccaniche simili a quelle della carne bollita.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOYER R., SAEWERT H. E., 1956. U. S. Patent n° 2, 730-448.

KIELSON N. A., 1965. U. S. Patent n° 3, 197-310.

LACOURT A., 1973. Soy proteins in french products with a meat base. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 51.

LEFEBVRE J., 1971. La production d'aliments texturés destinés à l'alimentation humaine à partir de protéines végétales. *Cah. Nut. Diet.*, **5** (4), 45-55.

SALE P., 1971. Évolution de quelques propriétés mécaniques du muscle pendant la maturation. *XVIIe European Meet. Meat Res. Workers, Bristol*, sept.

SALE P., TOURAILLE C., 1973. Influence de l'épaisseur initiale de l'échantillon sur les grandeurs caractéristiques du cisaillement des viandes. *XIXe European Meet. Meat Res. Workers, Paris*, sept.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (2), 159-174.

ÉTUDE D'HUILES ESSENTIELLES D'ORANGE

II. MODIFICATIONS CHIMIQUES AU COURS DU VIEILLISSEMENT

P. CARMONA, JUANA BELLANATO et A. HIDALGO

Institut d'Optique « Daza de Valdés », C. S. I. C., Serrano, 121 Madrid (Espagne)

RÉSUMÉ

On a étudié les modifications chimiques d'échantillons commerciaux d'huiles essentielles brutes d'orange pendant le vieillissement par irradiation ultraviolette, par irradiation visible, par chauffage à 60°C ou au cours du stockage.

Les principaux composés comportant des fonctions oxygénées, qui se forment à partir du limonène, au cours du vieillissement, ont été identifiés par spectroscopie infrarouge (précédée par la chromatographie en phase liquide sur colonne), et par chromatographie analytique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Finalement, on propose un mécanisme pour l'oxydation du limonène au cours du vieillissement de l'huile essentielle d'orange et on attribue aux flavones un rôle antioxydant.

Mots clés : *orange, huile essentielle, vieillissement.*

INTRODUCTION

Il est évident que la connaissance du processus de vieillissement de l'huile essentielle d'orange peut contribuer à trouver une meilleure solution pour son stockage. Cette connaissance implique la détermination des substances oxygénées qui prennent naissance au cours du vieillissement de cette huile essentielle, leurs mécanismes de formation, la stabilité relative des composants de cette huile essentielle au cours du vieillissement et la détermination des composants antioxydants.

Jusqu'à l'apparition des techniques modernes d'analyse, le vieillissement de l'huile essentielle d'orange était contrôlé par des mesures de densité et d'indices de réfraction, de peroxydes, d'acidité, etc. (GUENTHER, 1955). Le vieillissement était considéré comme un phénomène de polymérisation et d'oxydation, lequel pouvait être atténué par les substances donneuses d'hydrogène (FLORES et MORSE, 1952).

KESTERSON et HENDRICKSON (1951) ont étudié la stabilité de l'huile essentielle d'orange vis-à-vis de l'oxydation. Les composés antioxydants peuvent être adsorbés par les résidus blancs de l'écorce du fruit qui passent dans l'huile lors de

l'extraction de celle-ci par raclage et pression. Cette adsorption diminue la concentration en antioxydants et par conséquent la stabilité de l'huile essentielle vis-à-vis de l'oxydation.

ROGERS (1963) a utilisé la spectroscopie infrarouge et la chromatographie analytique en phase gazeuse pour l'identification de quelques substances provenant de l'autoxydation du limonène au cours du vieillissement de l'huile essentielle d'orange (*cis* et *trans*-carvéol, carvone et 1,2-époxylimonène), et pour l'identification des composants les plus stables vis-à-vis de ce processus.

Dans les travaux cités ci-dessus, les composants antioxydants de cette huile essentielle n'ont pas été déterminés.

SATO (1968) a fait une étude comparative du changement des propriétés associées à l'oxydation de l'huile essentielle d'orange. Il attribue la stabilité de ces huiles essentielles à la concentration en composés oxygénés en général.

Dans un travail précédent (CARMONA *et al.*, 1975), nous avons étudié par spectroscopie infrarouge la composition chimique de 19 échantillons commerciaux d'huiles essentielles d'orange de diverses origines.

Dans le présent travail nous étudions les points suivants :

— Le vieillissement des échantillons d'huiles essentielles d'orange de diverses origines au cours du stockage, lors d'un chauffage à différentes températures ou lors d'une irradiation ultraviolette-visible. Afin d'identifier dans les huiles essentielles brutes vieillies les neufs composés majeurs formés, nous avons employé la spectroscopie infrarouge.

— Le fractionnement par chromatographie en phase liquide sur colonne d'un échantillon d'huile essentielle vieillie, et l'étude par spectroscopie infrarouge des fractions obtenues.

Dans quelques cas, nous avons comparé les résultats acquis par spectroscopie infrarouge, par chromatographie analytique en phase gazeuse, ou par cette technique couplée à la spectrométrie de masse.

En nous fondant sur les proportions des composés dérivés du limonène qui se forment au cours du vieillissement modéré de l'huile essentielle d'orange, nous proposons un mécanisme pour l'oxydation du limonène dans cette huile essentielle et, en outre, attribuons aux flavones un rôle antioxydant.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine des échantillons

On a considéré 17 échantillons provenant, d'une part, de Valence, Murcie, Séville, et d'autre part, du Brésil, d'Israël, de Floride et de Rhodésie. Ces échantillons sont inclus dans le tableau 1 de notre travail antérieur (CARMONA *et al.*, 1975). En outre, nous avons considéré aussi un échantillon d'huile essentielle d'orange *Comuna* (première pression) provenant de Valence et de la récolte de 1976.

Spectroscopie infrarouge

Les spectres d'absorption infrarouge des huiles brutes vieillies et des fractions séparées par chromatographie en phase liquide sur colonne ont été obtenus sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 457 avec les conditions expérimentales de notre travail cité ci-dessus.

Chromatographie en phase liquide sur colonne

Nous avons laissé vieillir 230 heures à 60°C l'échantillon n° 5 du tableau 1 de notre travail antérieur. Il a été fractionné par chromatographie en phase liquide sur colonne dans les conditions indiquées dans ce même travail.

Chromatographie analytique en phase gazeuse

La fraction comportant des fonctions oxygénées de l'échantillon cité ci-dessus a été étudiée par chromatographie analytique en phase gazeuse. Nous avons aussi utilisé les conditions expérimentales de notre travail précédent.

Spectroscopie ultraviolette

Les absorbances de la bande à 330 nm correspondant aux flavones des huiles essentielles d'orange ont été mesurées sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 350.

En utilisant l'éthanol comme solvant, on a préparé des solutions contenant 10 mg d'huile/ml. Les cellules sont en quartz et ont 1 cm d'épaisseur.

Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse

Un échantillon d'huile essentielle d'orange (n° 2 du tableau 1 de notre travail précédent, vieilli pendant 230 heures à 60°C a été fractionné par chromatographie analytique en phase gazeuse et les composés des pics qui augmentent au cours du vieillissement ont été analysés au moyen d'un spectromètre de masse Perkin-Elmer 270, couplé au chromatographe analytique 990 de la même firme.

Nous avons utilisé les conditions chromatographiques suivantes : Colonne capillaire de 12 m de longueur et 0,7 mm de diamètre intérieur. Elle est garnie de Chromosorb W-IV AW ; phase stationnaire de Reoplex 400 ; imprégnation par passage d'une solution de Reoplex 400 à 0,2 p. 100 en Cl_2CH_2. Débit d'azote : 10 ml/mn ; distribution de flux : 1 : 15. Détecteur à ionisation de flamme ; pression d'hydrogène : 0,6 kg/cm^2 ; pression d'air : 1 kg/cm^2. Température de four constante : 140°C. Température de l'injecteur : 100°C.

Méthodes utilisées pour le vieillissement des échantillons

Dans les expériences citées ci-dessous, les échantillons sont déposés dans des récipients bouchés, le système de fermeture étant perméable à l'air.

Pour le vieillissement des échantillons, on a utilisé les méthodes suivantes.

a) *Par irradiation ultraviolette-visible.*

Cette irradiation a été réalisée dans deux instruments :

1. Dans un Xenotest 150 Hanau, possédant une lampe au xénon de 1 500 W. Les radiations de cette lampe sont soumises à une filtration adéquate pour obtenir des radiations dont la distribution spectrale est comprise entre 300 nm et 1 100 nm avec un maximum d'énergie à 500 nm.
2. Dans un irradiateur Osram possédant une lampe Osram Ultravitalux de 300 W, avec une distribution spectrale comprise entre 280 nm et 1 800 nm et un maximum d'énergie à 360 nm.

Quatre millilitres de différents échantillons — numéros 4, 6, 9 — 12 du tableau 1 de notre travail précédent — sont déposés dans des tubes en quartz de 8 ml de volume et sont soumis aux radiations d'une lampe de xénon dans l'instrument Xenotest 150 Hanau pendant 8, 24 et 102 heures à la température ambiante. Postérieurement ces mêmes échantillons sont conservés à 8°C environ pendant 5 années.

En outre, dans les deux instruments cités ci-dessus, nous avons irradié quatre échantillons de la même huile essentielle de la récolte de 1976, citée auparavant. A cette fin, dans chaque instrument est déposé un tube en quartz de 8 ml de volume et un autre tube en verre de même volume, chaque tube contenant 4 ml de l'huile essentielle. Le temps d'exposition est 102 heures dans le Xenotest 150 Hanau et 162 heures dans l'irradiateur Osram. Dans celui-ci les échantillons atteignent une température de 30-40°C environ.

b) *Par chauffage.*

Trois millilitres de chaque échantillon inclus dans le tableau 1 de notre travail antérieur (CARMONA *et al.*, 1975) sont déposés dans des tubes en verre fermés de 5 ml de volume et mis à 60°C dans une étuve, pendant 30, 85 et 230 heures.

c) *Par stockage.*

Trois millilitres de chaque échantillon inclus dans le tableau 1 du travail cité ci-dessus ont été stockés dans des tubes en verre de 5 ml de volume, fermés et transparents, pendant une année à la température ambiante.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Vieillissement produit par irradiation ultraviolette-visible

Huiles essentielles brutes.

Les modifications produites sur les huiles essentielles brutes par l'irradiation ultraviolette-visible, dans les conditions expérimentales de notre travail, sont plus faibles que celles provoquées par chauffage. Ce phénomène peut être expliqué en considérant que les conditions utilisées pour vieillir les échantillons sont probablement moins énergétiques dans le premier cas que dans le second.

Dans les expériences réalisées dans le Xenotest 150 Hanau et dans l'irradiateur Osram, on a trouvé que l'irradiation ultraviolette-visible affecte surtout les composants de l'huile essentielle possédant des doubles liaisons conjuguées. En effet, on a observé une diminution des bandes à 1 595 cm^{-1} (ν (C = C) conjuguée du myrcène), 1 515 et 835 cm^{-1} (ν (C = C) aromatique et γ (C — H) hors du plan des noyaux aromatiques des flavones). La diminution des bandes à 1 515 et 835 cm^{-1} est simultanée à un accroissement de l'absorption à 1 715 cm^{-1} (ν (C = O) des cétones). L'échantillon de la récolte de 1976 montre, après l'expérience réalisée dans le Xenotest, seulement une petite diminution des flavones et à peine les modifications chimiques des autres substances citées ci-dessus. Le vieillissement, dans cet échantillon, est très lent du fait de sa concentration élevée en flavones et même de l'influence d'autres composés oxygénés dont la concentration est plus grande dans cet échantillon.

L'accroissement de l'absorption à 1 715 cm^{-1} (ν (C = O) des cétones) peut partiellement provenir des flavones, qui par l'action des photons peuvent former un dimère cyclique contenant un groupe C = O non conjugué à une double liaison. NIELSEN (1970) suggère la possible dimérisation des composés de ce type par irradiation ultraviolette-visible.

En outre, dans les spectres infrarouges des huiles vieillies, on observe un petit accroissement des absorptions à 3 400 cm^{-1} (ν (O — H) des alcools), 1 678 et 1 110 cm^{-1} (ν (C = O) et ν (C — C) cyclique de la carvone), et une petite augmentation des bandes à 1 040 cm^{-1} (ν (C — O) du *cis*-carvéol) et 940 cm^{-1} (γ (= CH) du *trans*-carvéol).

On observe que les échantillons les plus stables sont, comme nous verrons plus tard, ceux les plus riches en flavones. Dans notre travail, ces échantillons sont ceux provenant de Floride (obtenu à partir des fruits verts, récolte 1970) et Valence (récolte 1976).

Dans les expériences les plus récentes réalisées avec un échantillon provenant de Valence (*Comuna*, 1976), on a observé que les modifications chimiques de l'huile essentielle augmentent d'autant plus que le spectre d'émission de la lampe de xénon se déplace vers la région de l'ultraviolet. Au bout de 162 heures d'exposition aux radiations ultraviolettes-visibles, on a observé aussi une concentration notable de substances polymérisées. En outre, dans les tubes en verre, les modifications chimi-

TABLEAU I

Huile essentielle d'orange brute vieillie par la radiation UV-visible et postérieurement stockée à 8°C environ pendant 5 années Relation d'absorbances $A_{1720\ cm^{-1}}/A_{1645\ cm^{-1}}$ *et absorbance à 330 nm*

Échantillon (mode d'extraction)	Origine	$A_{1720\ cm^{-1}}/A_{1645\ cm^{-1}}$	A (330 nm) ([1])
1re pression (fruit vert)	Floride (1970)	0,70	1,45
1re pression	Rhodésie (1970)	1,17	1,16
1re pression	Murcie (1970)	1,51	1,13
1re pression	Valence (1970)	2,14	1,01

A : absorbance.
([1]) Concentration 10 mg/ml ; l = 1 cm.

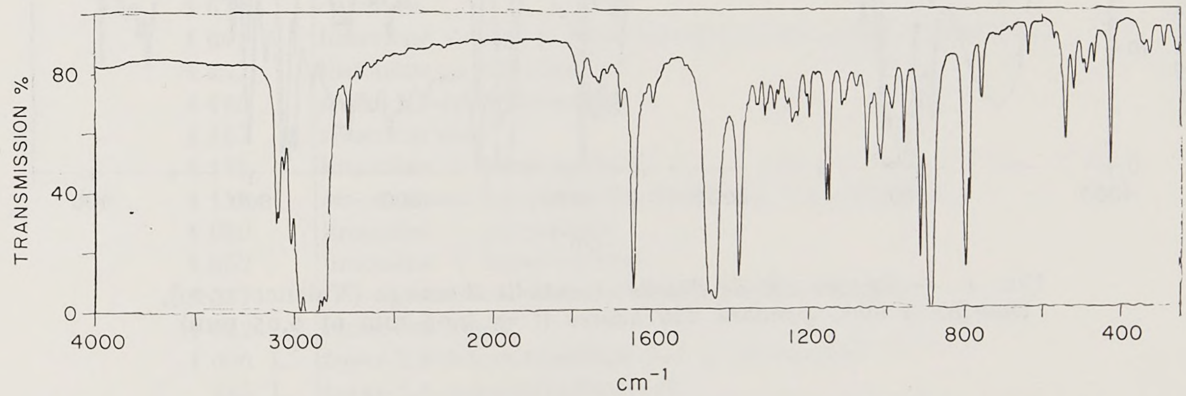


FIG. 1. — *Spectre IR de l'huile essentielle d'orange* (Valence 1970) (l = 0,03 mm)

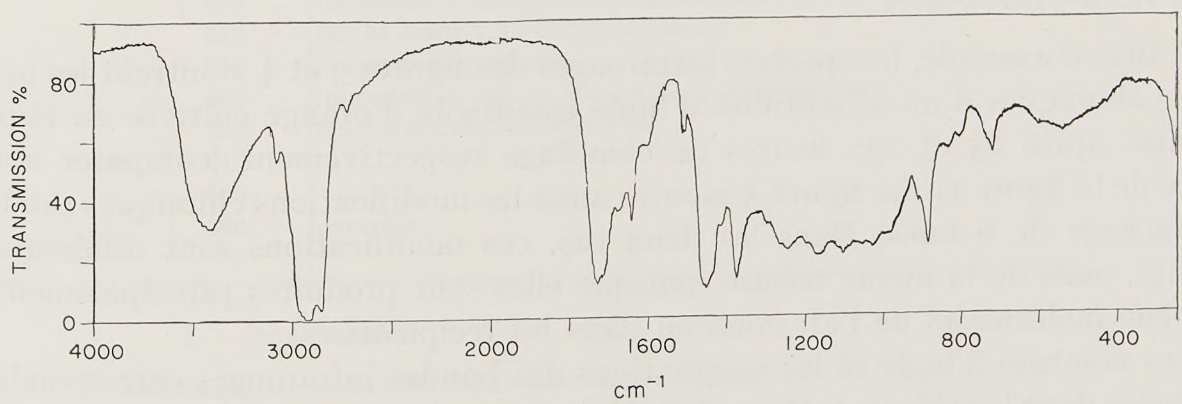


FIG. 2. — *Spectre IR de l'huile essentielle d'orange* (Valence 1970) *soumise à irradiation ultraviolette-visible pendant 102 heures et conservée à 8°C environ pendant 5 années* (Film)

ques de l'huile essentielle sont très semblables à celles produites dans les tubes en quartz, mais plus profondes dans le second cas.

Il faut noter que les échantillons du tableau 1 soumis aux radiations ultraviolettes-visibles montrent, au cours d'un stockage ultérieur, même conservées à 8°C environ (comparer fig. 1 et 2), une altération plus grande que celle produite par le vieillissement au cours du stockage à la température ambiante ou par chauffage (fig. 3-4).

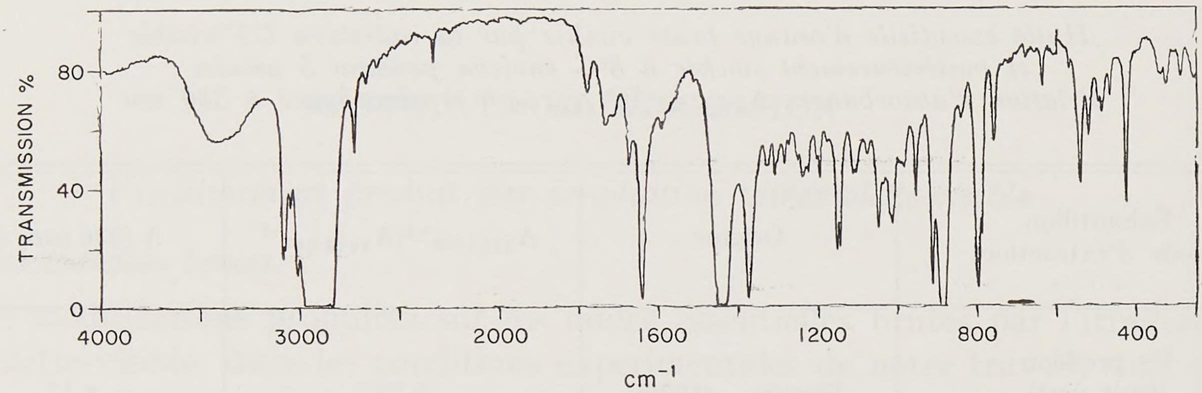


FIG. 3. — *Spectre IR de l'huile essentielle d'orange* (Valence 1970), *chauffée à 60°C pendant 85 heures* (l = 0,05 mm)

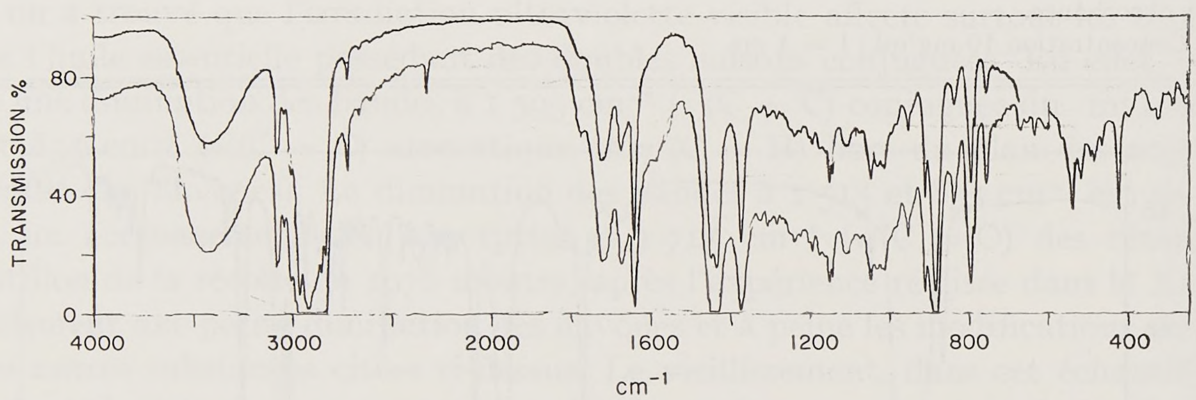


FIG. 4. — *Spectre IR de l'huile essentielle d'orange* (Valence 1970), *chauffée à 60°C pendant 230 heures* (l = 0,03 mm et 0,05 mm)

Vieillissement par chauffage ou stockage

Huiles essentielles brutes.

A titre d'exemple, les spectres infrarouges des figures 3 et 4 montrent les modifications chimiques d'un échantillon d'huile essentielle d'orange cultivée en Espagne produites après 85 et 230 heures de chauffage respectivement (comparer avec le spectre de la figure 1). La figure 5 montre aussi les modifications chimiques produites par stockage de 6 mois. Dans les deux cas, ces modifications sont différentes en intensité, mais de la même nature, puisque elles sont produites principalement par l'oxygène moléculaire de l'air contenu dans les récipients.

Les nombres d'onde et les assignations des bandes infrarouges correspondantes sont inclus dans le tableau 2. On a réalisé les assignations de ces bandes en les comparant avec celles des échantillons étalons et avec des spectres publiés dans la littérature (NEWHALL, 1964 ; MITZNER *et al.*, 1968 ; WYLDE et TEULON, 1970).

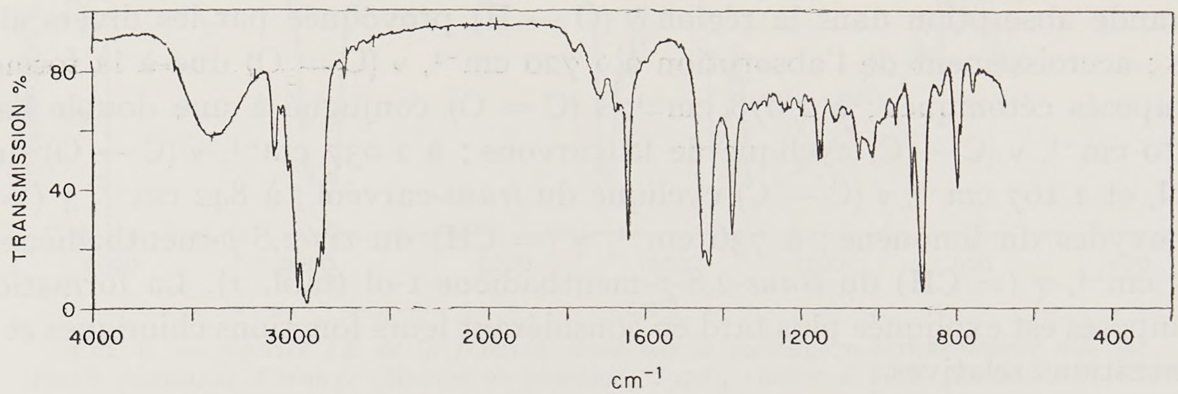


FIG. 5. — *Spectre IR de l'huile essentielle d'orange* (Valence 1970), *stockée à la température ambiante pendant 6 mois* (l = 0,03 mm)

TABLEAU 2

Résultats de l'analyse infrarouge de l'huile essentielle d'orange douce brute. Composants oxygénés créés pendant le vieillissement à 60°C pendant 230 heures

cm^{-1}	Composant
3 430	alcools (*cis*- et *trans*-carvéol, etc.)
1 720	cétones non conjuguées
1 678	carvone
1 642	limonène + *cis*- et *trans*-carvéol + époxydes du limonène
1 242	limonène + carvone
1 180	*trans*-1,2-époxylimonène
1 167	*trans*-carvéol
1 151	limonène + *trans*-carvéol
1 110	*cis*- et *trans*-2,8-*p*-menthadiène-l-ol + carvone
1 080	limonène + *cis*-carvéol
1 052	limonène + *trans*-carvéol
1 037	*cis*- et *trans*-carvéol + *trans*-1,2-époxylimonène
1 022	limonène-10-ol?
1 000 L	*trans*-2,8-*p*-menthadiène-1-ol + *cis*-carvéol
985 L	*trans*-2,8-*p*-menthadiène-l-ol
950 L	*cis*- et *trans*-2,8-*p*-menthadiène-1-ol + *trans*-carvéol + *trans*-1,2-époxylimonène
890	limonène + composés d'oxydation avec le groupe = CH_2
842	*cis*- et *trans*-1,2-époxylimonène
805 L	*cis*- et *trans*-carvéol
760	limonène + *cis*- et *trans*-1,2-époxylimonène
736	*cis*-2,8-*p*-menthadiène-1-ol
675	
660	
400	carvone

L : épaulement.

Comme on peut l'observer dans les figures citées, les spectres infrarouges des échantillons chauffés pendant 230 heures montrent déjà de profondes altérations : une grande absorption dans la région ν (O — H) provoquée par les divers alcools formés ; accroissement de l'absorption à 1 720 cm^{-1}, ν (C = O) due à la formation de composés cétoniques ; à 1 678 cm^{-1}, ν (C = O) conjugué à une double liaison, et 1 110 cm^{-1}, ν (C — C) cyclique de la carvone ; à 1 037 cm^{-1}, ν (C — O) du *cis*-carvéol, et 1 167 cm^{-1}, ν (C — C) cyclique du *trans*-carvéol ; à 842 cm^{-1}, γ (= CH) des époxydes du limonène ; à 736 cm^{-1}, γ (= CH) du *cis*-2,8-*p*-menthadiène-1-ol, et 985 cm^{-1}, γ (= CH) du *trans*-2,8-*p*-menthadiène-1-ol (tabl. 1). La formation de ces composés est expliquée plus tard en considérant leurs fonctions chimiques et leurs concentrations relatives.

Au cours du vieillissement par chauffage, l'échantillon le plus stable est aussi celui qui contient la plus grande proportion de flavones (échantillon de la récolte de 1976 provenant de Valence et celui du numéro 11 inclus dans le tableau 1 de notre travail précédent). Ceci a déjà été observé dans le vieillissement par irradiation ultra-violette-visible. De même, les échantillons les plus affectés sont ceux provenant de Valence et Murcie (échantillons numéros 4 et 6 du tableau 1 de notre travail antérieur).

Interprétation des spectres infrarouges des fractions d'une huile essentielle vieillie séparées par chromatographie en phase liquide sur colonne.

a) *Fraction terpénique éluée par le* n-*hexane.*

Le spectre infrarouge de cette fraction correspond principalement au limonène avec une petite proportion de myrcène. En comparant ce spectre avec celui de la fraction terpénique de l'échantillon non vieilli, on peut observer que la concentration du myrcène a diminué par rapport au limonène. Le myrcène, donc, s'oxyde plus facilement que le limonène parce que, au cours du vieillissement, le myrcène peut créer des radicaux très stabilisés par résonance électronique (RUSSELL, 1959).

Ce spectre, ainsi que tous ceux des fractions de l'échantillon d'huile essentielle séparées par chromatographie en phase liquide sur colonne, montre seulement un vieillissement faible dû à un grand pourcentage des flavones dans l'huile essentielle brute.

b) *Fraction éluée par le mélange* n-*hexane-acétate d'éthyle.*

Cette fraction (fig. 6) montre un accroissement de la bande ν (OH) par rapport à la fraction correspondante de l'huile essentielle fraîche (CARMONA *et al.*, 1975). En outre, on peut observer une augmentation de l'absorption à 1 678 cm^{-1}, ν (*c* = O) de la carvone ; à 1 035 cm^{-1}, ν (C — O) du *cis* et *trans*-carvéol ; et à 890 cm^{-1}, γ (= CH_2) des composés oxygénés dérivés du limonène avec double liaison terminale, par exemple, carvone, carvéol, etc.

On observe aussi une diminution des bandes du linalol à 920 cm^{-1}, γ (= CH_2), et 838 cm^{-1}, γ (= CH) et des bandes des aldéhydes à 2 720 cm^{-1}, ν (CH). Étant donné que les bandes du linalol masquent les bandes les plus intenses des époxydes du limonène, ces composés ne peuvent pas être observés dans les conditions de notre travail dans cette fraction, contrairement à ce qui arrive dans l'huile essentielle brute. En outre, les esters (bandes infrarouges à 1 740 cm^{-1}, ν (C = O), 1 240 cm^{-1}, ν (C — O), 1 170 cm^{-1}, ν (O — R)) sont les composants les plus stables au cours du vieillissement.

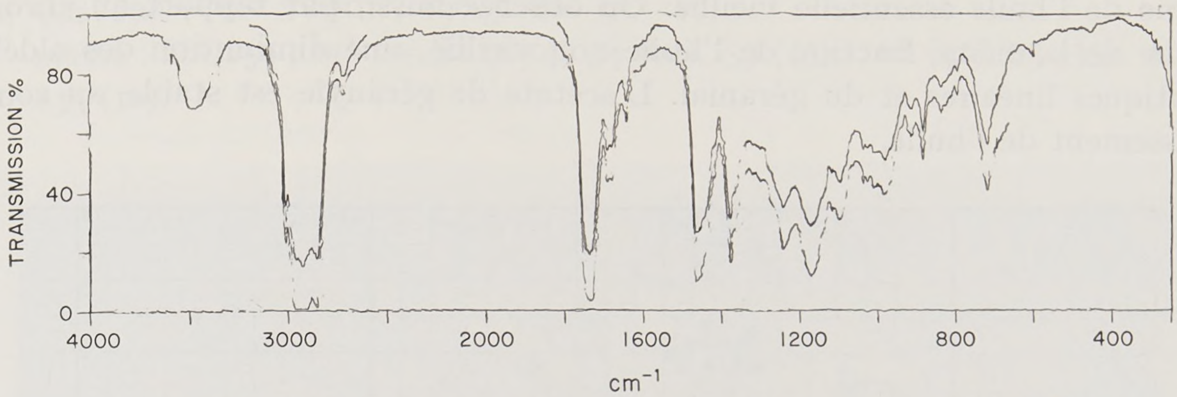


FIG. 6. — *Spectre IR de la fraction éluée par le mélange n-hexane-acétate d'éthyle. Huile essentielle d'orange* (Murcie 2e pression, 1970), *vieillie à 60°C pendant 230 heures*
(l = 0,03 mm et film)

c) Fraction éluée par l'acétate d'éthyle.

Le spectre infrarouge de la fraction éluée par l'acétate d'éthyle (fig. 7) montre un accroissement de la bande ν (OH), dû à la formation d'alcools, et une diminution corrélative des absorbances des bandes correspondant aux composés flavoniques, 1 645 cm^{-1}, ν (C = O), 1 515 cm^{-1}, ν (C = C) aromatique et 835 cm^{-1}, γ (CH) du noyau aromatique. La diminution de flavones au cours du vieillissement de l'huile essentielle d'orange peut être expliquée, comme nous le verrons plus tard, par l'addition des radicaux dérivés du limonène aux doubles liaisons conjuguées des flavones.

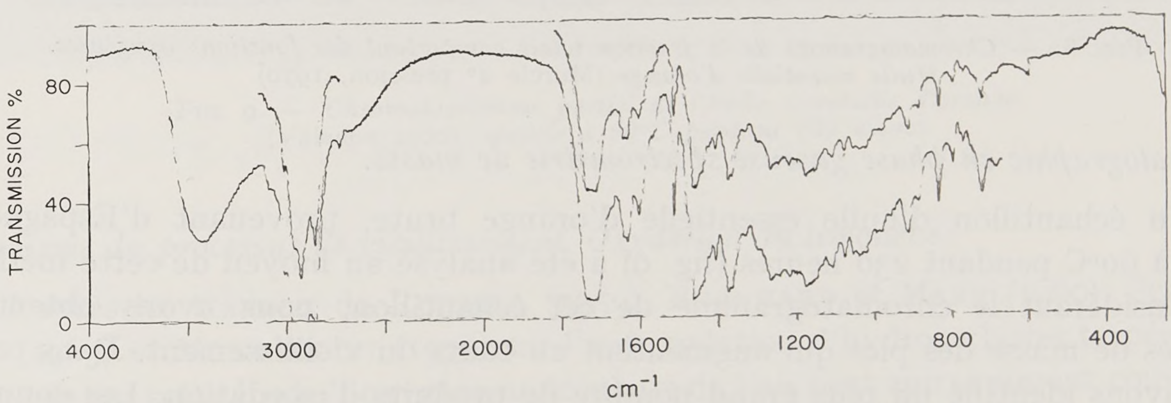


FIG. 7. — *Spectre IR de la fraction éluée avec l'acétate d'éthyle, en film. Huile essentielle d'orange* (Murcie 2e pression, 1970), *vieillie à 60°C pendant 230 heures*

Chromatographie analytique en phase gazeuse.

En outre, on a étudié par chromatographie analytique en phase gazeuse la fraction totale comportant des fonctions oxygénées de l'huile essentielle brute vieillie (fig. 8). Cette méthode nous a permis d'identifier successivement les composés suivants, dont le numéro de pic et le temps de rétention, en minutes, sont indiqués entre parenthèses : *n*-octanal (**1**, 21,9) *n*-nonanal (**2**, 27,5), citronellal (**5**, 30,5), linalol (**6**, 31,7), *n*-décanal (**7**, 33,6), terpinéol + néral (**9**, 38,6), carvone (**10**, 40,1), géranial (**11**, 41,8) et acétate de géranyle (**12**, 50,7). Ces composés ont été identifiés en comparant les temps de rétention des pics dans le chromatogramme avec les temps de rétention des substances pures. Étant donné les résultats obtenus par la spectrométrie de masse, qui sont décrits ci-dessous, les pics **3** et **4** peuvent être assignés aux époxydes du limonène. Ces pics, en plus du pic **10** correspondant à la carvone, sont dans ces conditions de travail les plus caractéristiques du chromato-

gramme de l'huile essentielle vieillie. On observe aussi, par rapport au chromatogramme de la même fraction de l'huile non vieillie, une diminution des aldéhydes aliphatiques linéaires et du géranial. L'acétate de géranyle est stable au cours du vieillissement de l'huile.

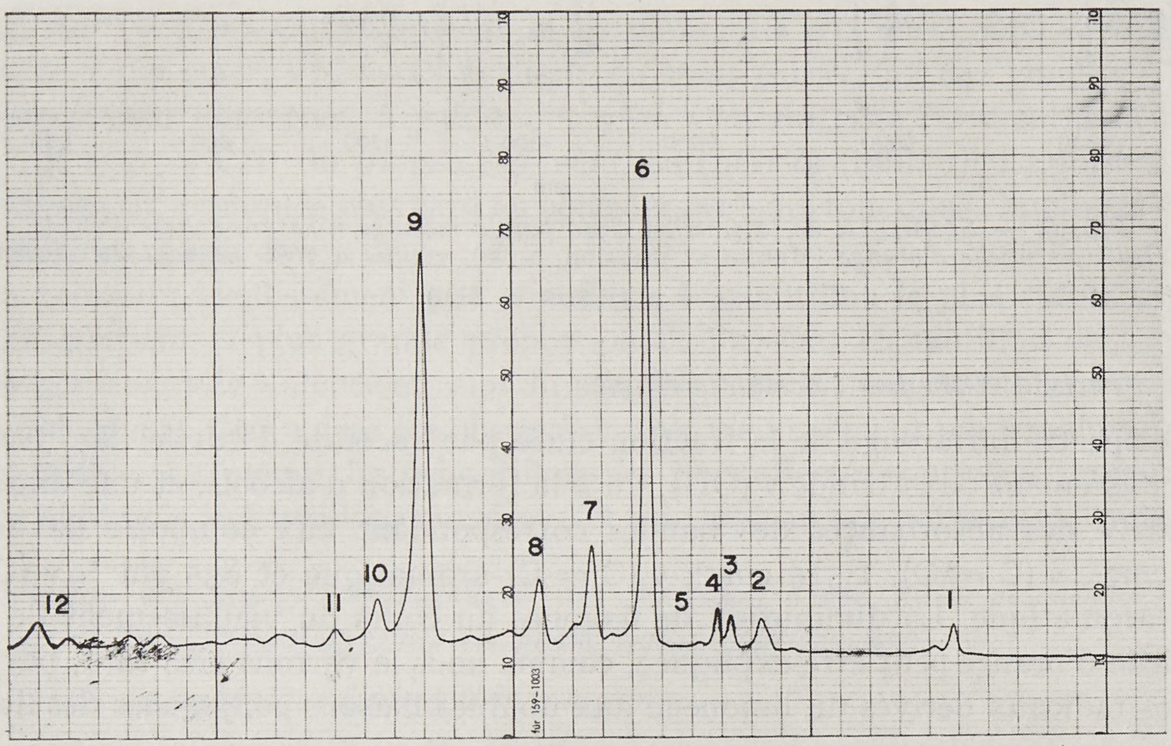


FIG. 8. — *Chromatogramme de la fraction totale comportant des fonctions oxygénées. Huile essentielle d'orange* (Murcie 2e pression, 1970)

Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse.

Un échantillon d'huile essentielle d'orange brute, provenant d'Espagne, et vieilli à 60°C pendant 230 heures (fig. 9) a été analysé au moyen de cette méthode. En considérant le chromatogramme de cet échantillon, nous avons obtenu les spectres de masse des pics qui augmentent au cours du vieillissement. Dans ce cas, nous avons identifié un plus grand nombre de produits d'oxydation. Les composés identifiés sont les suivants :

a) 1,2-époxylimonène (CORNU et MASSOT, 1966),
SM (spectre de masse, 70 *e*V),
m/*e* = 43 (100), 41 (87), 39 (75), 67 (60), 81 (47), 94 (38), 109 (31).

b) *cis* et *trans*-2,8-*p*-menthadiène-1-ol (HUNTER et MOSHONAS, 1966),
isomère *cis* : SM (70 *e*V),
masse : M^+ 152 ; *m*/*e* = 43 (100), 41 (86), 134 (68), 39 (57), 79 (46), 94 (45), 67 (18),
isomère *trans* : SM (70 *e*V),
m/*e* = 43 (100), 41 (73), 94 (67), 39 (52), 79 (48), 67 (12), 68 (10).

c) *cis* et *trans*-carvéol (HUNTER et MOSHONAS, 1966),
isomère *cis* : SM (70 *e*V),
m/*e* = 84 (100), 41 (60), 134 (53), 55 (42), 109 (41), 91 (39), 119 (33),
isomère *trans* : SM (70 *e*V),
m/*e* = 84 (100), 109 (90), 41 (65), 55 (50), 39 (48), 119 (45), 134 (36).

d) Carvone (VON SYDOW, 1964). SM (70 *e*V),
masse : M^+ 150 ; m/e = 82 (100), 54 (62), 39 (45), 108 (42), 93 (35), 41 (25), 135 (10).

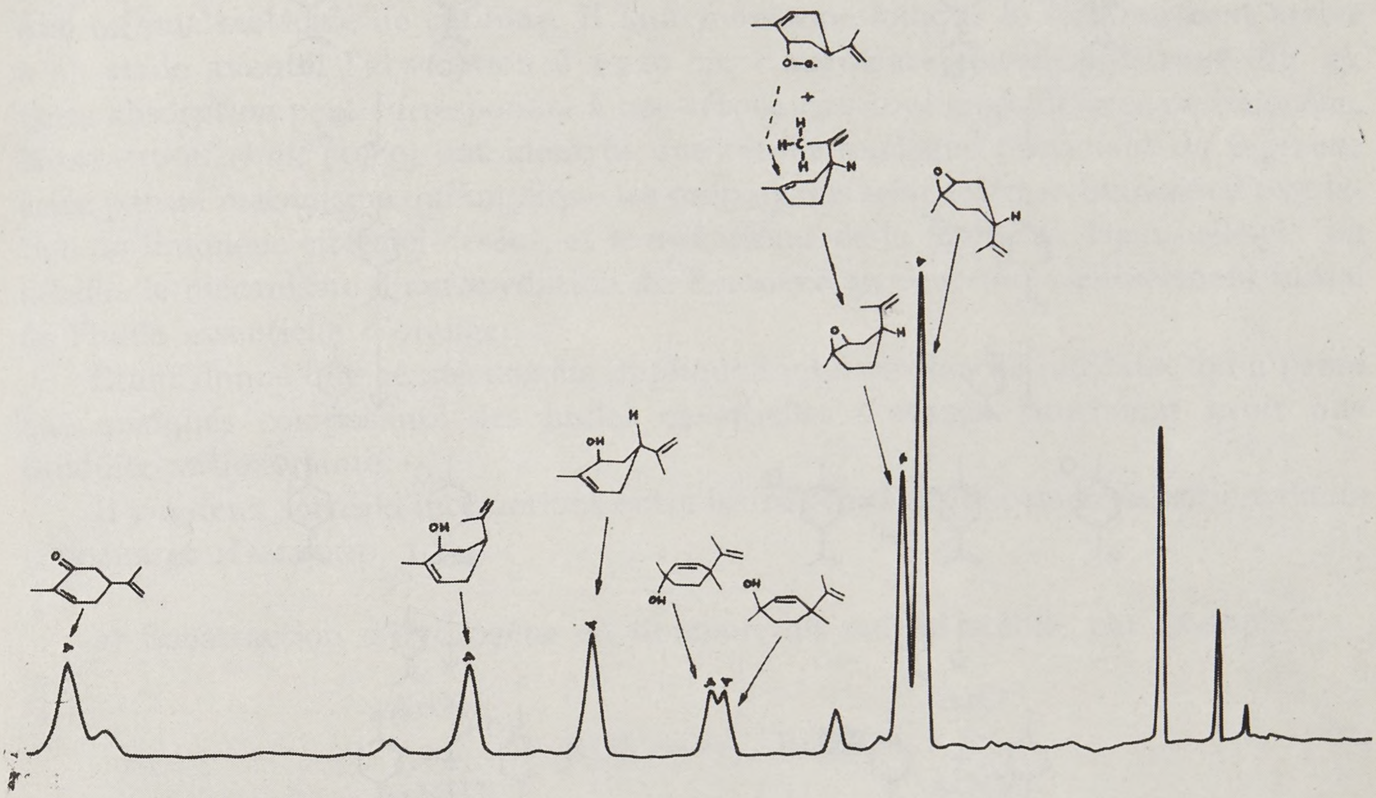


FIG. 9. — *Chromatogramme partiel de l'huile essentielle d'orange* (Valence 1970), *vieillie à 60°C pendant 230 heures*

Mécanisme du processus de vieillissement. Oxydation du limonène.

D'après les travaux de RUSSELL (1959), BERNHARD et MARR (1960), SCHENCK *et al.* (1965) et MONTAUDON (1972) sur l'autoxydation d'hydrocarbures terpéniques, confirmés par cette étude, l'oxygène moléculaire de l'air peut agir vraiment comme un initiateur de radicaux libres. Ainsi, l'oxygène soustrait un atome d'hydrogène au carbone contigu à une double liaison, créant ainsi un radical hydrocarboné dont la charge électrique est soumise à résonance allylique (fig. 10). La soustraction d'un hydrogène a lieu sur les carbones C_3 ou C_6, mais pas en C_4. Ce phénomène peut être expliqué par des exigences de l'état de transition qui, pour un recouvrement maximal de l'orbitale du radical libre avec l'orbitale de la double liaison, impose que la liaison C-H brisée soit axiale par rapport au plan de la double liaison. Quand celle-ci et son carbone allylique ne sont pas dans le même cycle, cette exigence entraîne une perte dans le degré de liberté de rotation (VORONENKOV et TITOVA, 1971).

Le radical hydrocarboné étant formé, il est admis qu'il réagit avec l'oxygène moléculaire de l'air pour former un peroxyradical (RUSSELL, 1959), (MONTAUDON, 1972). Selon ces auteurs, le peroxyradical peut réagir avec le limonène en suivant plusieurs voies. Cependant, compte tenu des concentrations relatives des produits d'oxydation du limonène, on peut déterminer quelle est la réaction la plus favorisée dans l'autoxydation du limonène au cours du vieillissement de l'huile essentielle d'orange.

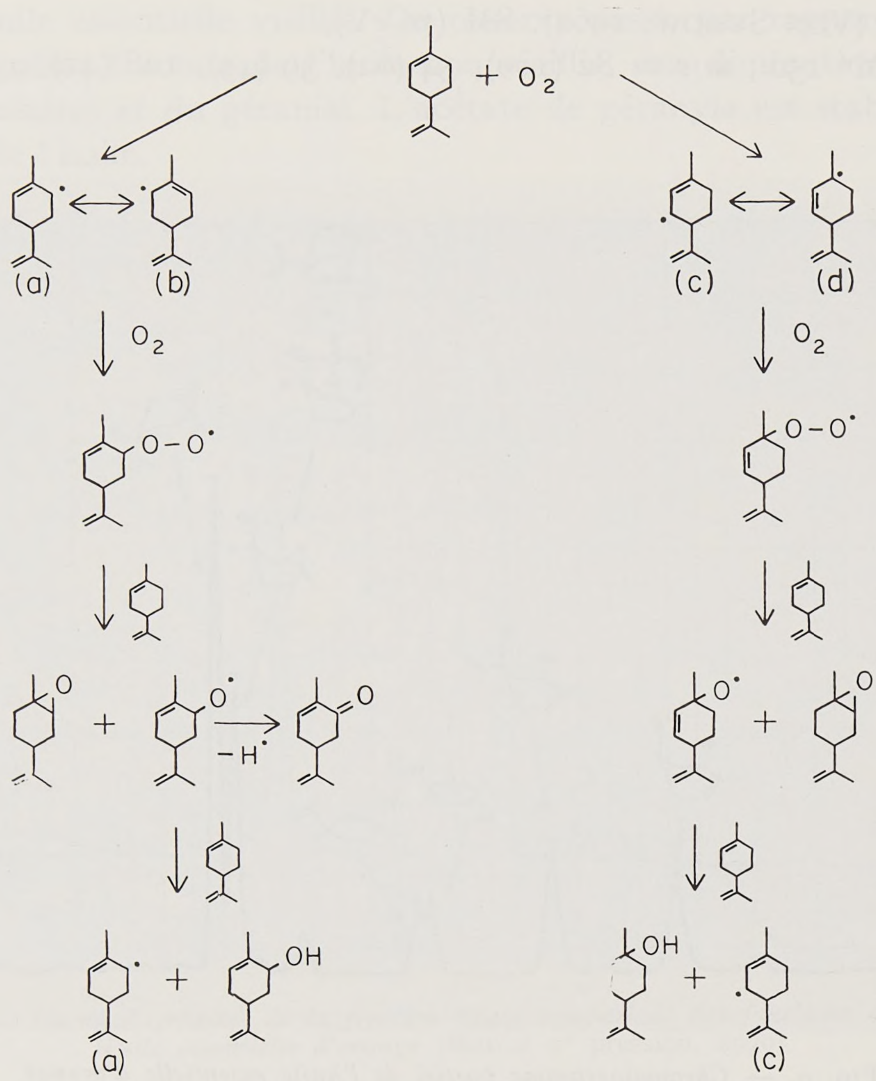


FIG. 10. — *Mécanisme d'autoxydation du limonène au cours du vieillissement de l'huile essentielle d'orange*

En effet, si on désigne par le symbole $\rangle C = C \langle$ une oléfine quelconque, le peroxyradical peut réagir selon :

$$2\ ROO\cdot \longrightarrow 2\ RO\cdot + O_2 \qquad (a)$$

$$ROO\cdot + RH \longrightarrow ROOH + R\cdot \qquad (b)$$

$$ROO\cdot + \rangle C = C \langle \longrightarrow ROO - \overset{|}{\underset{|}{C}} - \overset{|}{\underset{|}{C}}\cdot \longrightarrow RO\cdot + \rangle \overset{O}{C - C} \langle \qquad (c)$$

Selon la réaction (*c*), un peroxyradical réagit avec une oléfine et il en résulte un époxyde et le radical RO·. Celui-ci peut réagir avec un hydrocarbure terpénique en donnant soit une molécule d'alcool soit une molécule de carvone. Enfin, selon cette réaction (*c*), pour chaque molécule d'époxyde formée apparaîtra en même temps une molécule d'alcool ou une molécule de carvone (fig. 10).

Nous croyons que la réaction la plus favorisée dans l'autoxydation du limonène au cours du vieillissement de l'huile essentielle d'orange dans les conditions décrites est la réaction (*c*) parce que, si la double liaison oléfinique est activée par conjugaison électronique ou par substitution, le peroxyradical ROO· s'additionne à cette oléfine au lieu de soustraire un atome d'hydrogène en donnant un hydroperoxyde,

RUSSELL (1959), MONTAUDON (1972). En effet, si dans le chromatogramme de l'échantillon d'huile brute vieillie (fig. 9) on intègre, d'une part, les surfaces corrigées des alcools et de la carvone et, d'autre part, les surfaces corrigées des époxydes du limonène, le quotient entre les deux sommes approche de 1. C'est-à-dire que pour chaque molécule d'époxyde formée apparaîtra en même temps une molécule d'alcool ou une molécule de carvone. Il faut noter que lorsque le vieillissement arrive à un stade avancé, l'absorption à 1 720 cm^{-1} augmente considérablement (fig. 4). Cette absorption peut correspondre à une cétone non conjuguée dérivée du limonène. MONTAUDON *et al.* (1969) ont identifié une cétone analogue provenant du β-pinène créée par un mécanisme qui implique les proportions relatives des composés d'oxydation du limonène citées ci-dessus, et le mécanisme de la figure 10. Dans celle-ci, on détaille le mécanisme d'autoxydation du limonène au cours du vieillissement initial de l'huile essentielle d'orange.

Étant donné que ce mécanisme implique l'intervention de radicaux, on a pensé que quelques composants des huiles essentielles d'orange pourraient avoir une conduite antioxydante.

Il y a deux sortes d'interactions entre les radicaux et les composés antioxydants (BOOZER et HAMMOND, 1954) :

a) Soustraction d'hydrogène en donnant un radical stable, par exemple :

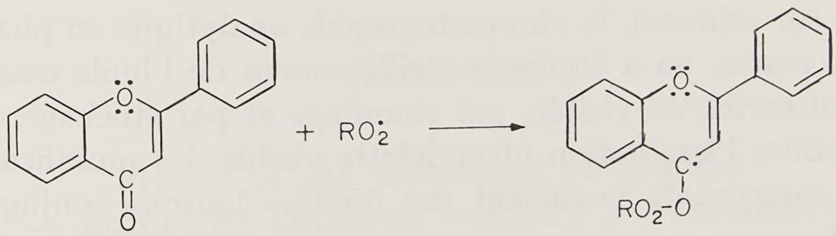
$$\begin{matrix} ArOH \\ ou \\ ArNHR \end{matrix} + RO_2^{\bullet} \longrightarrow RO_2H + \begin{matrix} ArO^{\bullet} \\ ou \\ Ar\dot{N}R \end{matrix}$$

b) Formation d'un complexe moléculaire stable :

$$\begin{matrix} RO_2 & + In & \rightleftarrows & (In—RO_2^{\bullet}) \\ (In—RO_2) & + RO_2^{\bullet} & \rightleftarrows & Molécule \end{matrix}$$

In étant l'inhibiteur de l'autoxydation.

Le complexe In—$RO_2^{\bullet}$ peut se stabiliser au moyen d'un phénomène de résonance. A ce deuxième type peuvent appartenir les flavones, compte tenu qu'elles contiennent beaucoup de liaisons conjuguées :



L'union du radical $RO_2^{\bullet}$ aux flavones est en accord avec la diminution de l'absorbance de la bande n → π* (330 nm) dans le spectre ultraviolet au cours du vieillissement de l'huile essentielle.

Des résultats expérimentaux sont inclus dans la figure 11 où nous avons comparé le stade du vieillissement de plusieurs échantillons, mesuré par l'absorbance de la bande à 3 500 cm^{-1}, en face de l'absorbance de la bande à 330 nm, mesurée dans les

spectres ultraviolets, qui est proportionnelle à la concentration des flavones. Les huiles essentielles contenant le plus de flavones sont celles qui ont atteint le stade de vieillissement le moins avancé.

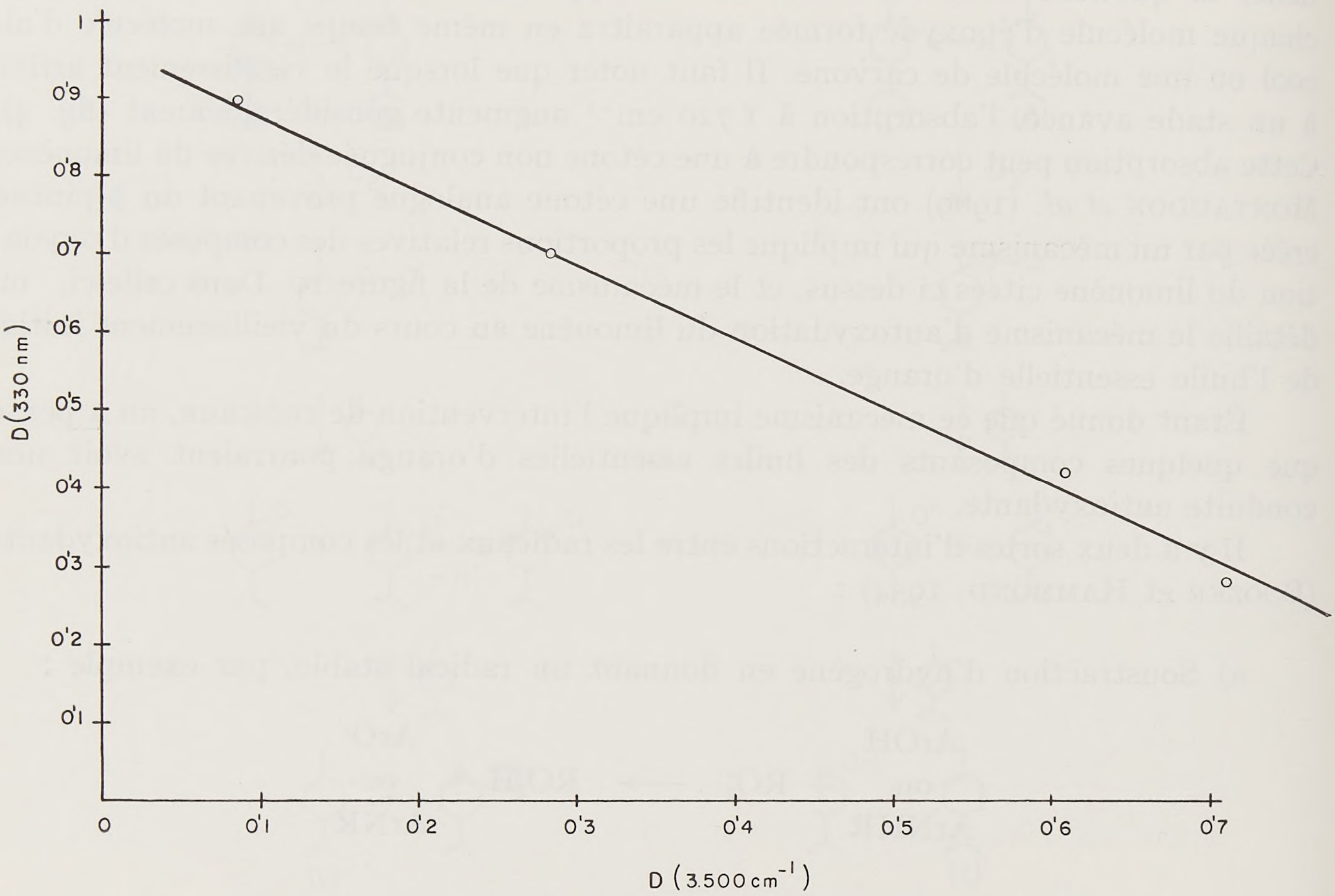


FIG. 11. — *Concentration des flavones* (absorbances à 330 nm dans l'éthanol ; c = 10 mg/ml ; l = 1 cm) *par rapport au stade de vieillissement* (absorbance à 3 500 cm^{-1} pour le liquide ; l = 0,1 mm) *des huiles essentielles d'orange*

CONCLUSIONS

En employant la spectroscopie infrarouge (précédée de la chromatographie en phase liquide sur colonne), la chromatographie analytique en phase gazeuse et la spectrométrie de masse, on a étudié le vieillissement de l'huile essentielle d'orange par irradiation ultraviolette-visible, par chauffage et par stockage.

Quand on utilise l'irradiation ultraviolette-visible, les modifications chimiques portent sur les composants possédant des doubles liaisons conjuguées, comme le myrcène et les flavones.

Au cours du vieillissement par chauffage ou stockage, les modifications chimiques portent sur des composants tels que les aldéhydes et le limonène.

Dans les huiles essentielles vieillies, on a détecté les substances suivantes dérivées du limonène : carvone, *cis* et *trans*-1,2-époxylimonène, *cis* et *trans*-carvéol, *cis* et *trans*-2,8-*p*-menthadiène-1-ol. En outre, on a constaté la présence d'une cétone non conjuguée, dont la concentration augmente quand le stade de vieillissement est avancé. Les concentrations relatives de ces substances sont cohérentes avec le

mécanisme d'autoxydation du limonène qui est proposé dans ce travail. Ce mécanisme implique l'intervention de radicaux et, par conséquent, les flavones sont des composants qui peuvent agir comme substances antioxydantes.

Reçu pour publication en mai 1976.

SUMMARY

STUDY OF ORANGE ESSENTIAL OILS
II. — CHEMICAL MODIFICATIONS DURING AGING

The chemical modifications of commercial samples of orange oil have been studied after treatment of this oil either *a*) by ultraviolet-visible radiation, *b*) after heating at 60°C or *c*) by storage at room temperature.

The principal limonene oxygenated derivatives which appear during the aging have been identified by infrared spectroscopy (after separation by column chromatography) and gas chromatography-mass spectrometry.

A mechanism for the limonene autoxidation during the orange oil aging is proposed. An antioxidant behaviour is attributed to the flavones.

RESUMEN

ESTUDIO DE ACEITES ESENCIALES DE NARANJA
II. — MODIFICACIONES QUIMICAS EN EL CURSO DEL ENVEJECIMIENTO

Se han estudiado las modificaciones químicas sufridas por muestras comerciales de aceites esenciales de naranja después de someterlas a la radiación ultravioleta-visible, a almacenamiento a 60°C o a temperatura ambiente.

Los principales compuestos oxigenados derivados del limoneno que aparecen durante el envejecimiento han sido identificados por espectroscopia infrarroja (tras un fraccionamiento por cromatografía en columna) y cromatografía de gases-espectrometria de masa.

Se ha propuesto un mecanismo para la autooxidación del limoneno durante el envejecimiento del aceite y se atribuye a las flavonas una conducta antioxidante.

RIASSUNTO

STUDIO DI OLI ESSENZIALI DI ARANCIA.
II. — MODIFICHE CHIMICHE DURANTE L'INVECCHIAMENTO

Sono state studiate le modifiche chimiche di campioni commerciali di oli essenziali grezzi di arancia durante l'invecchiamento, mediante irradiazione ultravioletta, mediante irradiazione visibile e mediante riscaldamento a 60°C o nel corso dello stoccaggio.

I principali composti che comprendono delle funzioni ossigenate che si formano a partire dal limonene durante l'invecchiamento, sono stati individualizzati mediante spettroscopia infrarossa (preceduta dalla cromatografia in fase liquida su colonna) e mediante gas-cromatografia analitica associata alla spettrometria di massa.

E' proposto infine un metodo per l'ossidazione del limonene durante l'invecchiamento dell'olio essenziale di arancia e un ruolo antiossidante è stato attribuito ai flavoni.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BERNHARD R. A., MARR A. G., 1960. The oxidation of terpenes. I. Mechanism and reaction products of D-limonene autooxidation. *Food Res.*, **25**, 517-530.

BOOZER C. E., HAMMOND G. S., 1954. Molecular complex in free radical reactions. *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 3861-3862.

CARMONA P., BELLANATO JUANA, HIDALGO A., 1975. Étude d'huiles essentielles d'orange. I. Analyse par spectroscopie infrarouge. *Ann. Technol. agric.*, **24** (1), 83-98.

CORNU A., MASSOT R., 1966. *Compilation of mass spectral data.* Heyden and Son Ltd., London.

FLORES H., MORSE R. E., 1952. Deterioration of orange oil. *Food Technol.*, **6**, 6-8.

GUENTHER E., 1955. *The essential oils.* Vol. I. D. van Nostrand Company, Inc. New York.

HUNTER G. L. K., MOSHONAS M. G., 1966. Analysis of alcools in essential oils of grapefruit, lemon, lime and tangerine. *J. Food Sci.*, **31**, 167-71.

KESTERSON J. W., HENDRICKSON R., 1951. Oxidative stability of orange oil as related to method of extraction. *Amer. Perfum. Cosmet.*, **57**, 441.

MITZNER B. M., MANCINI V. J., LEMBERG S., THEIMER E. T., 1968. Infrared spectra of monoterpenes and related compounds. II. Terpene alcohols. *Appl. Spectro.*, **22** (1), 34-53.

MONTAUDON E., FRANÇOIS H., LALANDE R., 1969. Autoxydation du β-pinène en présence d'anhydride acétique. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2773.

MONTAUDON E., 1972. Autoxydation de divers hydrocarbures insaturés en milieu anhydride acétique. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **10**, 3797-3808.

NEWHALL W. F., 1964. Derivatives of (+) -limonene. III. A stereospecific synthesis of *cis* and *trans*-Δ 8 (9)-*p*-menthene 1,2-epoxides. *J. Org. Chem.*, **26**, 185-187.

NIELSEN B. E., 1970. Coumarins of umbelliferous plants. *Dansk Tidssk. for Farm.*, **44**, 111-286.

ROGERS J. A., 1963. Instrumentation : its place in citrus oils industrie. *Amer. Perfum. Cosmet.*, **78**, 17-23.

RUSSELL G. A., 1959. Fundamental processes of autooxidation. *J. Chem. Educ.*, **36** (3), 111-118.

SATO T., 1968. Oxidation of perfumes. *Yakuzaigaku*, **28** (1), 80-83.

SCHENCK G. O., NEUMULLER O. A., OHLOFF G., 1965. Zur Autoxydation des (+) -Limonens. *Ann.*, **687**, 26-39.

VON SYDOW E., 1964. Mass spectrometry of terpenes. III. Monoterpene aldehydes and ketones. *Acta Chem. Scand.*, **18**, 1099-1104.

VORONENKOV V. V., TITOVA L. F., 1971. Effect of molecule configuration on the autoxidation of cycloolefins. *Dokl. Akad. Nauk* SSSR, **199** (3), 601-602.

WYLDE R., TEULON J. M., 1970. Les époxydes du limonène : synthèse et réactivité. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **2**, 758-64.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (2), 175-190.

ÉVOLUTION DES SUBSTANCES AZOTÉES AU COURS DU MÉTABOLISME ANAÉROBIE DE LA BAIE DE RAISIN

C. FLANZY, P. ANDRÉ, M. BURET, Y. CHAMBROY et M. FLANZY
avec la collaboration technique de M. TACCHINI

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,
84140 Montfavet

RÉSUMÉ

Les changements de concentrations des acides aminés libres, des acides aminés polypeptidiques et des acides aminés protéiques ont été suivis au cours du métabolisme anaérobie de baies de raisin *Carignan* placées, à l'obscurité, à 35°, 25° ou 15°C.

Les allures générales d'évolution des trois fractions azotées et de l'ammonium ont été observées. Des phénomènes simultanés de synthèse et de dégradation des substrats azotés ont été notés.

L'ensemble de ces résultats permet d'orienter de nouvelles recherches sur le métabolisme anaérobie des fruits après récolte et sur la vinification par macération carbonique.

Mots clés : *métabolisme anaérobie, raisin, substances azotées.*

ABRÉVIATIONS

MA : métabolisme anaérobie.

Les abréviations des acides aminés correspondent aux normes internationales (IUPAC-IUB, 1967) : Ala : Alanine ; Arg : Arginine ; Asp : Acide aspartique ; Cys : Cystéine ; Glu : Acide glutamique ; Gly : Glycine ; His : Histidine ; Ile : Isoleucine ; Leu : Leucine ; Lys : Lysine ; Met : Méthionine ; Phe : Phénylalanine ; Pro : Proline ; Ser : Sérine ; Thr : Thréonine ; Trp : Tryptophane ; Tyr : Tyrosine ; Val : Valine.

INTRODUCTION

La description que nous avons entreprise du métabolisme anaérobie (MA) des baies de raisin placées en atmosphère de dioxyde de carbone a porté, jusqu'à présent, sur l'évolution des acides organiques non cétoniques (FLANZY *et al.*, 1967) et sur la formation des produits de la fermentation intracellulaire (FLANZY *et al.*, 1974). Trois faits nous ont incité à compléter ces bilans par une étude sur les remaniements azotés qui pourraient se produire au cours du MA.

En premier lieu, l'augmentation d'azote assimilable des baies durant l'anaérobiose pourrait jouer sur l'amélioration des rendements de croissance de micro-organismes cultivés sur les moûts issus de ces baies (BARRE, 1969) ; un tel phénomène prend une grande importance dans la conduite des deux phases fermentaires d'une vinification par macération carbonique.

En second lieu, l'influence des acides aminés sur la formation des arômes des vins n'est pas négligeable (BIDAN, 1975). Cette influence est-elle particulièrement sensible pour les vins de macération carbonique qui présentent des caractéristiques aromatiques dont nous ignorons, sinon la nature, du moins l'origine ?

Enfin, les données de la littérature sur le métabolisme des substances azotées au cours du MA du raisin sont, à notre connaissance, rares et celles qui existent sont très fragmentaires.

Les enseignements tirés de nos essais préliminaires de 1969 et 1970 (FLANZY, 1971) nous ont conduit à monter, en 1971, une expérimentation qui devait nous permettre d'obtenir un bilan des substances azotées durant le MA.

Les résultats obtenus, principalement au cours de la troisième campagne, font l'objet de ce mémoire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal. Protocole expérimental

Les essais sont réalisés avec des baies de *Carignan noir* provenant du domaine expérimental de Pech-Rouge (I.N.R.A., GRUISSAN). Le prélèvement des baies, la constitution et la préparation des échantillons sont effectués selon la technique précédemment décrite (FLANZY *et al.*, 1974).

Les lots de 325 $\pm$ 2 baies (960 g) sont placés dans des bocaux Keller de 1,5 litres dont l'atmosphère est formée de dioxyde de carbone. Après des temps variables de stockage à la température de l'expérience, 35°, 25° ou 15°C, les bocaux sont ouverts et les baies qu'ils contiennent prélevées. Le moût de chaque échantillon est alors extrait au moyen d'un appareil pneumatique exerçant une pression de 3 kg par cm^2. Durant 15 jours, un lot de la série 35°C est analysé quotidiennement. Dans les séries 25 et 15°C, respectivement 4 et 3 prélèvements sont échelonnés entre 0 et 16 jours de métabolisme anaérobie.

Techniques analytiques

Les analyses sont effectuées sur le moût centrifugé (10 mn sous 1 500 *g*).

Substances azotées.

Fraction ammoniacale : le dosage de l'azote ammoniacal est effectué après déplacement de NH_4 par MgO et distillation (JAULMES, 1951).

Fractions aminées : le schéma analytique suivi est une adaptation de la technique de POUX et OURNAC (1970). Cinquante millilitres de moût centrifugé sont traités par 250 ml d'éthanol à 96°GL et maintenus 24 heures à — 20°C. Le surnageant alcoolique (V) est séparé du précipité protéique par centrifugation (2 400 *g*, 15 mn), puis passé à 4°C sur une colonne de résine échangeuse de cations (Permutite 50 forme H^+). Après rinçage à l'eau (3V), les composés aminés solubles sont élués en deux opérations successives :

1° passage de NH_4OH 2N (1,5 V) puis rinçage à l'eau (1,5 V) ;
2° passage de NH_4OH 4N (3 V) et rinçage à l'eau (1 V).

Ce système d'élution évite la dégradation de la glutamine (PION, communication personnelle). Les deux solutions récupérées sont évaporées, sous vide, séparément à 38°C jusqu'à disparition de NH_4OH. Elles sont alors rassemblées, amenées à sec puis reprises par 10 ml de tampon citrate de sodium pH = 2,2 (NaOH : 16,8 g ; acide citrique : 4,2 g ; acide octanoïque : 0,1 ml ; Brij 35 : 2 ml ; HCl : 32 ml ; thiodiglycol : 20 ml par litre de tampon). Une partie aliquote de 5 ml sert à l'analyse directe des acides aminés libres. L'autre fraction de 5 ml, après hydrolyse acide (100 ml HCl 6 N, 24 heures, 110°C) permet d'obtenir les acides aminés totaux (acides aminés libres + peptides). La différence entre les teneurs en acides aminés totaux et libres donne la mesure des acides aminés engagés surtout sous forme polypeptidique (POUX et OURNAC, 1970).

Fraction protéique : le précipité protéique obtenu par traitement à l'éthanol 96°GL de 50 ml de moût centrifugé est séché au dessiccateur puis repris par 10 ml d'eau bidistillée. Une partie aliquote de 5 ml, après hydrolyse acide (100 ml HCl 6N, 24 heures, 110°C) permet d'obtenir les acides aminés constitutifs des protéines.

Le dosage des acides aminés est réalisé selon le principe de SPACKMANN, STEIN et MOORE (1958) en utilisant un analyseur automatique BIOCAL BC 200. La séparation de la plupart des acides est obtenue sur une colonne de 50 cm de haut (diamètre 0,9 cm) remplie de résines échangeuses de cations Aminex 6 (résines sulfoniques, taux de réticulation de 8 p. 100, diamètre des grains : 17,5 μ). Les solutions d'élution sont des tampons au citrate de sodium de pH croissants (2,9 : 50 mn ; 3,25 : 105 mn ; 3,6 : 220 mn ; 4,5 : 450 mn). La température est de 57°C et le débit 90 ml par heure. L'arginine est séparée sur une colonne de 14 cm de haut (diamètre 0,9 cm) formée de résine Aminex 5 (diamètre des grains : 13μ), avec un tampon citrate de sodium pH = 5,28 en 160 mn, à 57°C, sous un débit de 90 ml par heure.

Autres substances.

Éthanol : il est dosé par la méthode de FLANZY *et al.* (1969).

Acide malique : il est mesuré au spectrophotomètre après oxyation en oxalo-acétate hydrazone par la malate déhydrogénase en tampon glycine-hydrazine (POUX, 1969).

Sucres réducteurs : ils sont dosés par la méthode de Gabriel BERTRAND.

RÉSULTATS

Remarques préliminaires

Le maintien des baies à 35°C permet d'obtenir en une dizaine de jours l'ensemble des cinétiques du métabolisme anaérobie relatives au catabolisme du malate (FLANZY *et al.*, 1967) et à la synthèse d'éthanol (FLANZY *et al.*, 1974). L'abaissement de la température d'anaérobiose à 25° et, *a fortiori*, à 15°C allonge considérablement la durée de l'essai ce qui alourdit encore un protocole expérimental laborieux. Dans ces conditions, nous avons choisi de préciser quotidiennement la composition azotée du moût des baies stockées à 35°C et de ne réaliser que de rares pointés aux deux autres températures. Les données obtenues à 25° et 15°C doivent donc être interprétées avec plus de réserves que celles enregistrées à 35°C.

Les fortes fluctuations dans les teneurs en acides aminés, mesurées d'un jour à l'autre, sont dues probablement en partie à un échantillonnage insuffisant et, en partie, à des rendements d'hydrolyse non précisés. D'autre part le pourcentage de récupération des protéines par précipitation à l'éthanol 80°GL dans un milieu riche en polysaccharides et en composés polyphénoliques peut fluctuer. Aussi, pré-

férons-nous présenter les résultats sous forme d'allures d'évolution des différentes fractions azotées plutôt que par les valeurs absolues des concentrations d'acides. Cette restriction dans l'exploitation des données numériques nous empêche d'effectuer les bilans chiffrés, acides aminés libres + acides aminés peptidiques + acides aminés protéiques, que nous désirions obtenir.

Évolution générale des substances azotées au cours du MA

L'évolution globale, à 35°C, de chaque fraction azotée est traduite par les variations de leur teneur respective en azote ramenée à un litre de moût (fig. 1). L'azote total pour chacun des trois groupes d'acides : libres, peptidiques et protéiques a été calculé à partir des valeurs individuelles de chaque acide.

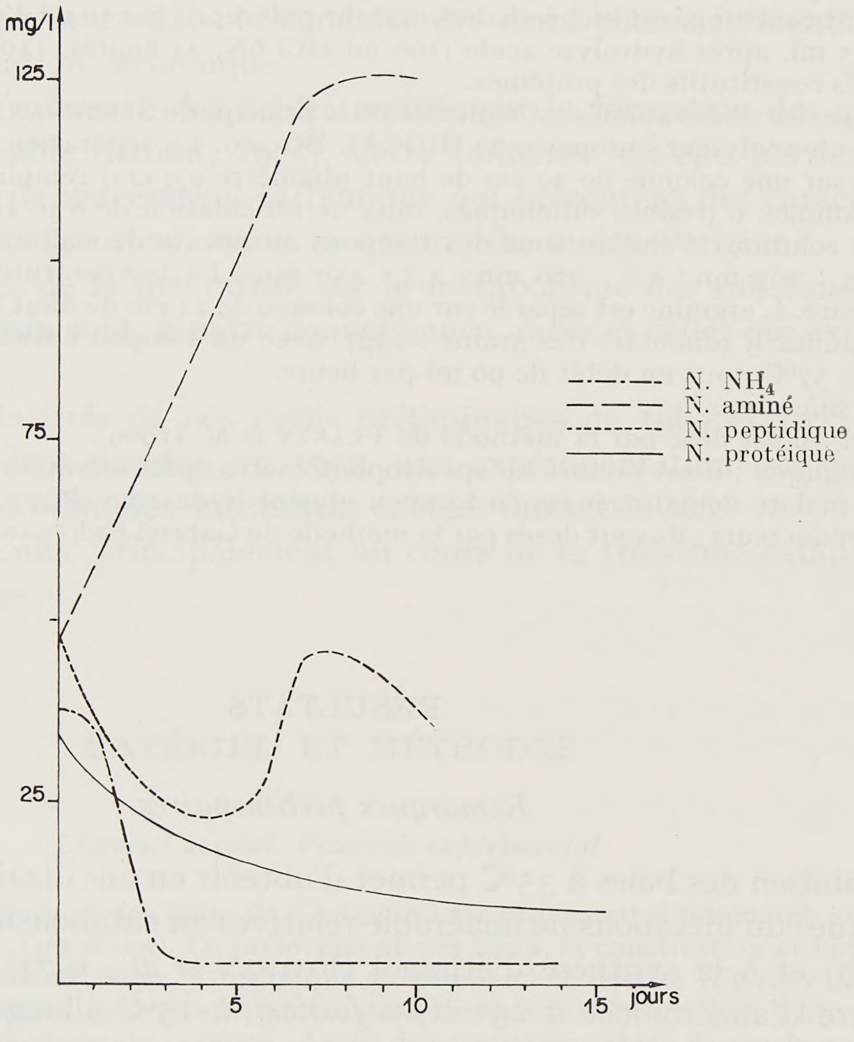


FIG. 1. — *Allures d'évolution des différentes formes d'azote au cours du métabolisme anaérobie, à 35°C*

L'azote ammoniacal chute brutalement pour atteindre un palier dès le troisième jour. L'azote protéique diminue d'une façon continue mais à vitesse progressivement atténuée tout au long de l'essai. L'azote peptidique présente une allure d'évolution tourmentée ; après une forte décroissance initiale et l'atteinte d'un minimum vers le cinquième jour, la courbe se redresse, passe par un maximum entre le septième et le neuvième jour, puis décroît à nouveau. Enfin, l'azote des acides aminés libres augmente très rapidement jusqu'à un palier situé du septième au dixième jour.

Acides aminés libres

Variabilité annuelle des teneurs en acides aminés libres.

Les moûts de raisin mûrs issus de la même vigne présentent, d'une année à l'autre, des teneurs en acides aminés libres souvent très différentes (tabl. 1). Ainsi, les quantités d'azote aminé total que nous obtenons sur *Carignan noir*, sit 27,8 mg/l en 1970 et 30,6 mg/l en 1971, sont nettement plus faibles que celles évaluées par Poux à 120, 5 mg/l au cours de la campagne 1964 (Poux, communication personnelle).

TABLEAU I

Influence de l'année sur la composition des moûts

Cépage : *Carignan* noir de même provenance pour les deux années d'expérimentation, 1970 et 1971.
MA jours : durée du métabolisme anaérobie (MA) des baies placées à 35°C dans une atmosphère formée de CO_2.
0 : moûts initiaux avant MA. 9 : moûts après 9 jours de MA.
Sucres et malate sont rapportés au litre de moût ; ils sont exprimés respectivement en grammes et milliéquivalents. Malate p. 100 : pourcentage d'acide malique catabolisé en 9 jours de MA. E°GL : éthanol exprimé en degrés Gay-Lussac.
Les acides aminés sont exprimés en micromoles par litre de moût. Les teneurs rapportées dans le tableau, au neuvième jour de MA, correspondent aux valeurs corrigées d'après la courbe d'évolution de chaque acide (fig. 2 à 6).

	MA (j)	Sucres (g/l)	E (°GL)	Malate (méq. l)	Malate (%)	Glu	Arg	Lys	Pro	Asp	Thr	Met	Ile
1970	0	199	0	64,5		254,3	20,1	5,4	1 041	117,4	84,1	non dosé	13
	9	non dosé	1°38	26,6	58,8	32	65	64	1 112	14,2	135,8	non dosé	78,1
1971	0	190	0	58,3		100	140	3,7	1 150	52	150	4,5	13
	9	non dosé	1°48	30,1	48,4	27	600	66	1 528	20	230	8	102

	MA (j)	Leu	Val	Ala	Ser	Gly	Cys	His	Phe	Tyr	Try	γAB
1970	0	11,3	21,9	188,4	112,3	20	0	12,2	16,3	4,6	non dosé	non dosé
	9	100	120	130	95,5	195	10,6	34	92	60	non dosé	non dosé
1971	0	13	25,5	377	97	14	traces	13	8	4,5	19	350
	9	145	162	638	192	242	17,2	45	122	80	0	2 500

Cette forte variabilité quantitative annuelle, pour un même cépage, a déjà été signalée (Flanzy et Poux, 1965 *b*). Dans ces conditions, afin de donner une signification générale à nos interprétations, il convient de s'attacher davantage aux allures d'évolution des acides aminés qu'aux valeurs absolues de leurs teneurs.

Une telle conclusion rejoint les réserves formulées au chapitre « Remarques préliminaires ».

Fréquemment, une similitude apparaît entre les évolutions de 1970 et de 1971. Nous nous appuyons donc sur les données de 1970 lorsque les observations de 1971 sont insuffisantes pour donner une idée précise des cinétiques.

Azote aminé libre total

Les deux phases dans l'évolution de l'azote aminé total (fig. 1) correspondent à un schéma cinétique déjà rencontré au cours de l'étude du MA, en particulier pour les critères « production d'éthanol » (FLANZY *et al.*, 1974) et « production de succinate » (FLANZY *et al.*, 1967).

Les pourcentages d'accroissement des moûts en azote aminé (différence de teneur entre X_i jours et le départ · 100/teneur au départ) entre 0 et 5 jours d'une part, 0 et 9 jours d'autre part, sont respectivement en 1971 de : 76 (18 en 1970 et 117 (32 en 1970). Ces pourcentages sont fortement augmentés si nous ajoutons l'azote aminé du γ-aminobutyrate ; ils atteignent, en effet, les valeurs de 113 et 171.

Acides aminés individuels

Remarques.

Dans la série placée à 35°C, des pertes lors de la fixation du matériel végétal ont eu lieu pour l'échantillon du sixième jour ; les mesures réalisées donnent donc des valeurs par défaut. D'autre part, il n'est pas tenu compte des résultats relatifs aux onzième et quinzième jours, des contaminations microbiennes ayant été observées dans les échantillons correspondants.

En bonne concordance avec l'évolution de l'azote aminé libre total, les courbes représentatives de la majorité des acides montrent une croissance plus ou moins rapide, avec atteinte d'un palier entre 6 et 10 jours. Ce dernier est suivi ou non d'une décroissance (fig. 2 à 7). Dans cette première catégorie se rangent : arginine (Arg), glycocolle (Gly), histidine (His), isoleucine (Ile), leucine (Leu), lysine (Lys), phénylalanine (Phe), tyrosine (Tyr), valine (Val) et γ-aminobutyrate (γAB). Alanine (Ala), sérine (Ser), thréonine (Thr) font partie de ce groupe en 1971 mais en diffèrent en 1970 (chute initiale ou décroissance continue). La proline (Pro) évolue peu.

Enfin, les teneurs en aspartate (Asp) et glutamate (Glu), après une chute initiale brutale, croissent lentement jusqu'au dixième jour.

Une estimation quantitative du métabolisme global de chaque acide aminé peut être calculée, entre 0 et 9 jours de MA, par le rapport : $\frac{\text{teneur au 9}^{\text{e}}\text{ jour}}{\text{teneur au départ}}$ (tabl. 2). Les coefficients ainsi obtenus se classent en quatre groupes.

1° Coefficients supérieurs à 10 : Lys, Tyr, Gly, Phe.

2° Coefficients de 3 à 10 : Arg, Val, His, Leu, Ile, γAB.

3° Coefficients oscillant autour de 1 ou compris entre 1 et 2. Ils traduisent de faibles variations quantitatives : Ser et Ala ; Pro, Thr.

4° Coefficients inférieurs à 0,5. Ils correspondent à des acides dont la teneur diminue fortement : Glu, Asp.

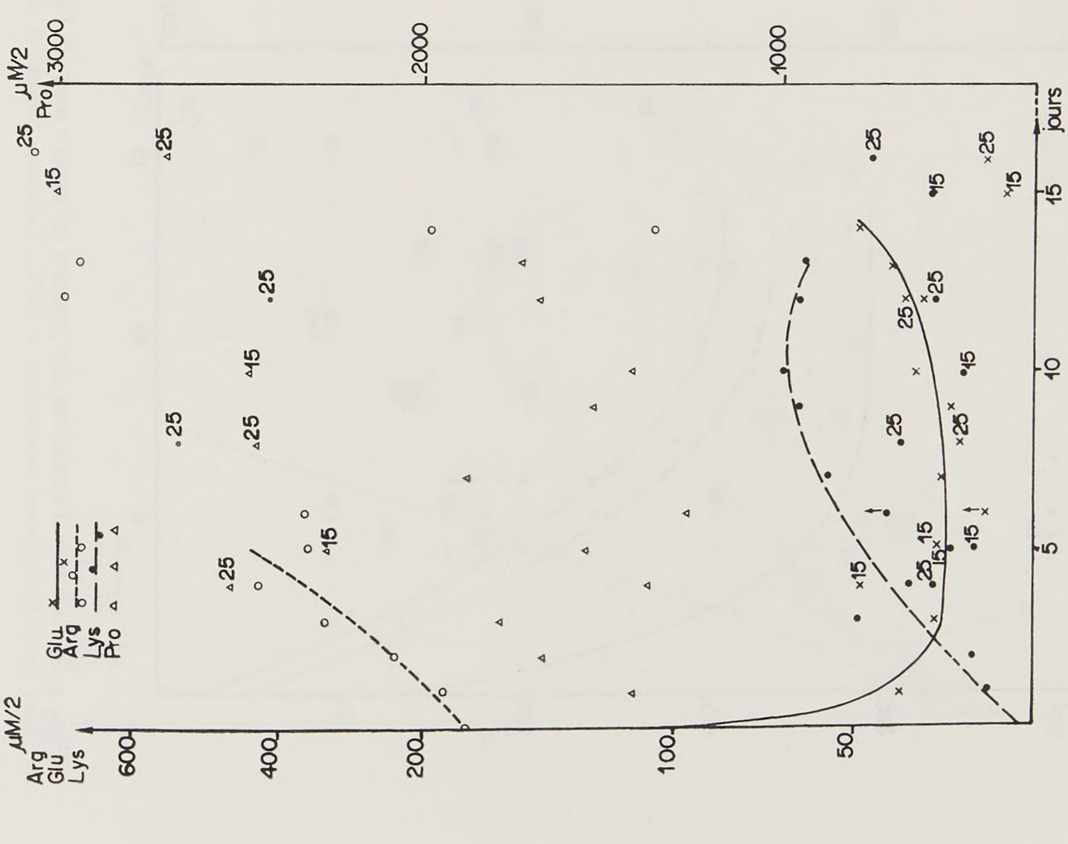


FIG. 2. — *Allures d'évolution des teneurs en acides aminés libres au cours du métabolisme anaérobie, à 35°C. Acide glutamique, arginine, lysine et proline*

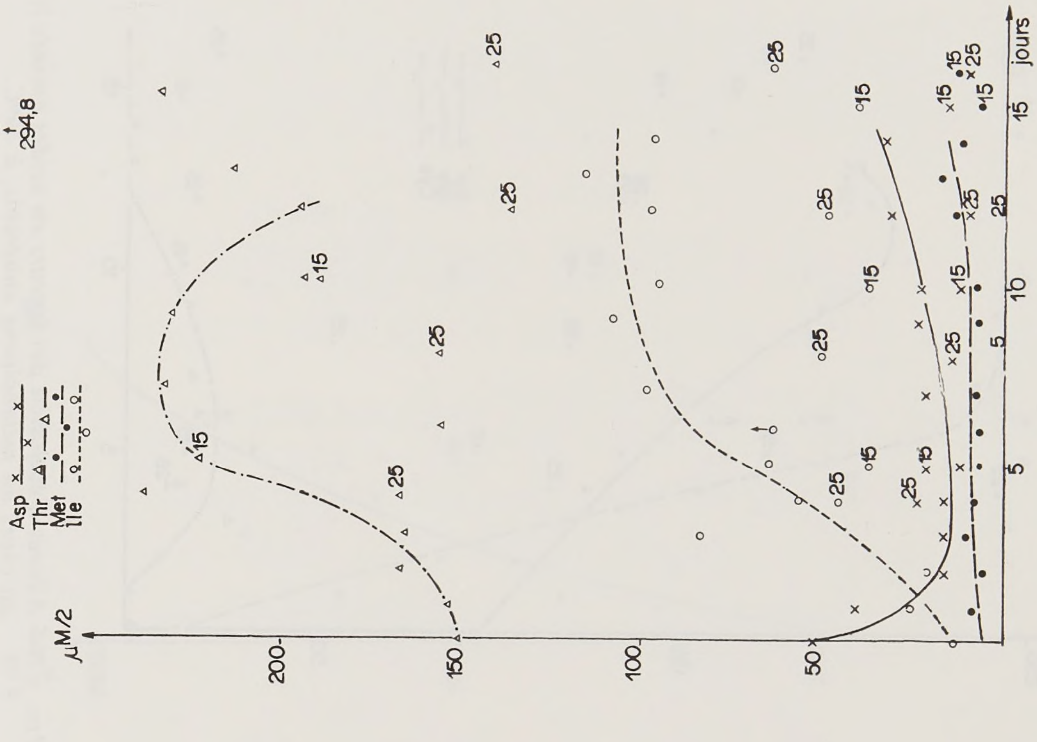


FIG. 3. — *Allures d'évolution des teneurs en acides aminés libres au cours du métabolisme anaérobie, à 35°C. Acide aspartique, thréonine, méthionine et isoleucine*

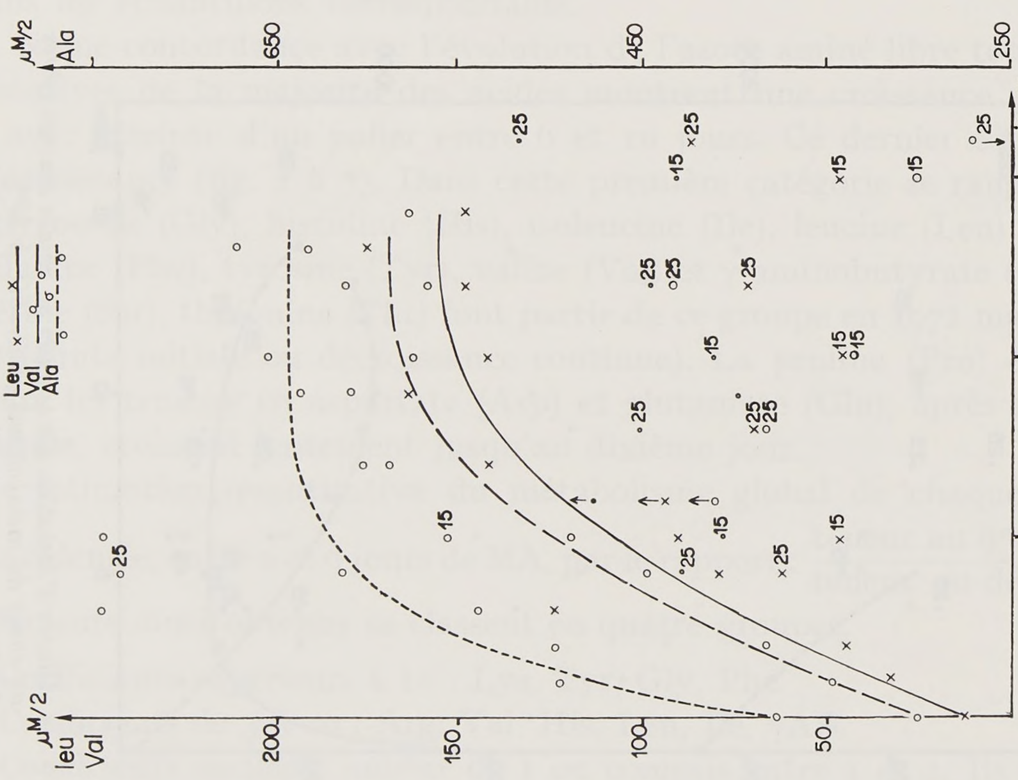


FIG. 4. — *Allures d'évolution des teneurs en acides aminés libres au cours du métabolisme anaérobie, à 35°C. Leucine, valine et alanine*

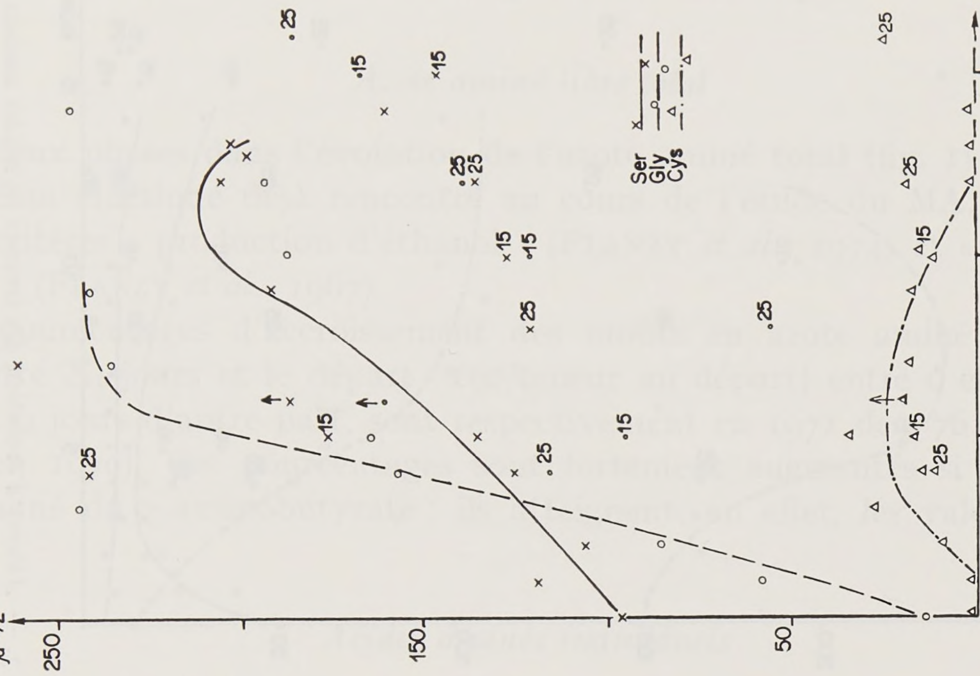


FIG. 5. — *Allures d'évolution des teneurs en acides aminés libres au cours du métabolisme anaérobie, à 35°C. Sérine, glycocolle et cystéine ou cystine*

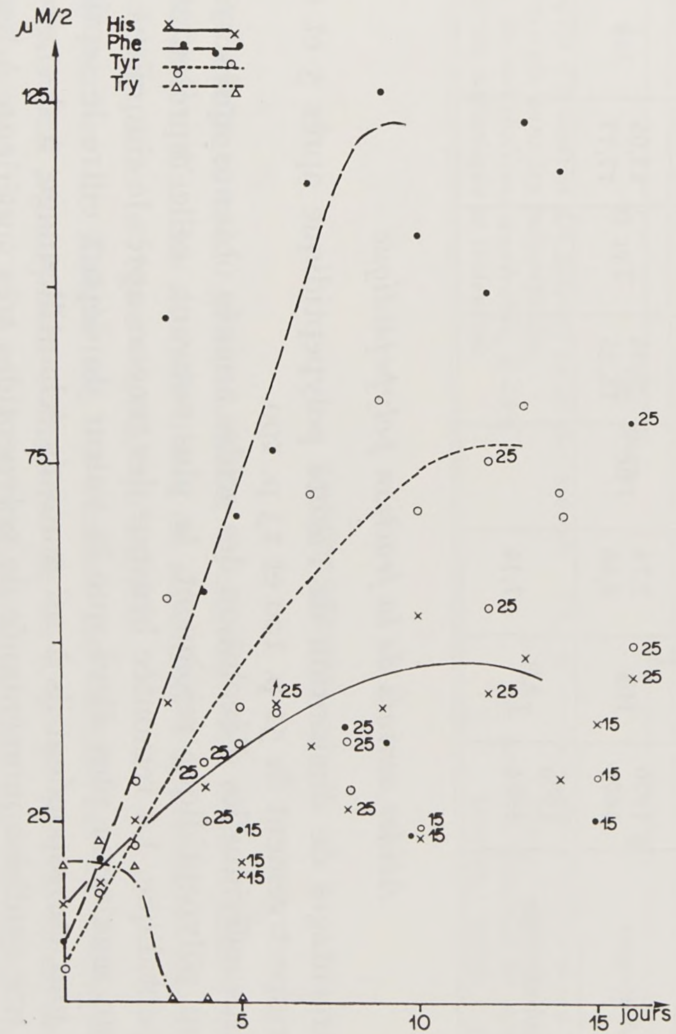


FIG. 6. — *Allures d'évolution des teneurs en acides aminés libres au cours du métabolisme anaérobie, à 35°C. Histidine, phénylalanine, tyrosine et tryptophane*

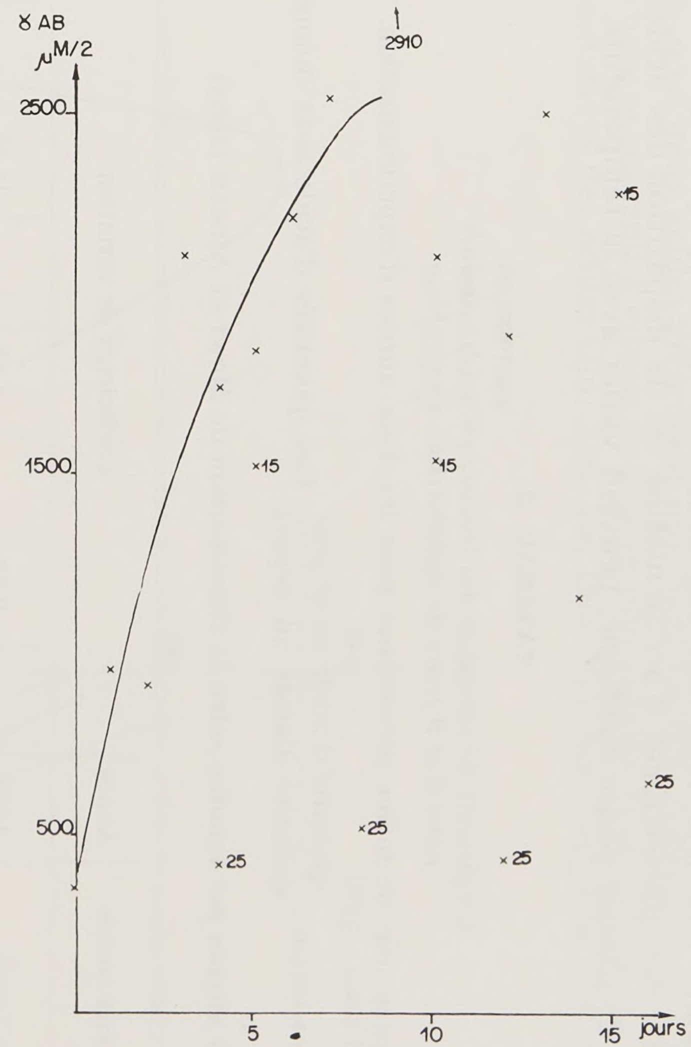


FIG. 7. — *Allure d'évolution de la teneur en acide γ aminobutyrique de la fraction « acides aminés libres », au cours du métabolisme anaérobie, à 35°C*

Au neuvième jour de MA, quatre acides prédominent quantitativement dans la fraction aminée « libre » : γAB, Pro, Ala, Arg.

Évolutions comparées à 35°C, 25°C, et 15°C.

Des analogies apparaissent aux trois températures considérées dans les allures d'évolution pour : Glu, Lys, Arg, Asp, Ile, Leu, Val, Gly, His, Tyr, Phe.

L'intensité des phénomènes d'accumulation ou de disparition des acides, ainsi que la durée de chaque phase cinétique, peuvent varier avec la température.

TABLEAU 2

Coefficients de variation des teneurs en acides aminés entre 0 et 9 jours de métabolisme anaérobie

Cépage : *Carignan* noir de même provenance pour les deux années d'expérimentation. Température de l'essai : 35°C.

Coefficient de variation : $\frac{\text{quantité d'acide au 9}^{\text{e}}\text{ jour}}{\text{quantité d'acide au départ.}}$ Les quantités d'acide sont données dans le tableau 1.

Les acides sont alignés par familles selon la classification de Moat et Ahmad (1965).

Familles d'acides aminés	Année	Coefficients de variation							
Dérivés de l'acide α-céto-glutarique	1970 1971	Glu	0,12 0,27	Arg	3,23 4,28	Lys	11,85 17,83	Pro	1,06 1,32
Dérivés de l'acide aspartique	1970 1971	Asp	0,12 0,38	Thr	1,61 1,53	Met	 1,77	Ile	6,00 7,84
Dérivés de l'acide pyruvique	1970 1971	Leu	8,84 11,15	Val	5,47 6,35	Ala	0,69 1,69		
Sérine-glycine cystéine	1970 1971	Ser	0,85 1,97	Gly	9,75 17,28	Cys	10,60 17,20		
Acides aromatiques	1970 1971	His	2,78 3,46	Phe	5,64 15,25	Tyr	13,04 17,77	Try	 0,00
Acide γ-aminobutyrique	1970 1971	γAB	 7,14						

Acides aminés de la fraction polypeptidique

Les pourcentages de diminution de l'azote polypeptidique après 5 et 9 jours de MA sont respectivement de 51 p. 100 et 13 p. 100.

Les allures individuelles d'évolution des acides aminés obtenus après hydrolyse de la fraction polypeptidique rejoignent, le plus souvent, celle représentative de l'azote polypeptidique. La remontée brusque des teneurs après le cinquième jour et l'atteinte d'un maximum plus élevé que la valeur de départ entre le septième et le neuvième jour correspondent-ils à un mauvais échantillonnage, à des erreurs de dosage ou à une synthèse momentanée de polypeptides très supérieure à leur catabolisme ? Nous ne pouvons répondre, actuellement, à cette question. Les acides Glu, Lys, Asp, Ile, Thr, Phe, Tyr, Leu, Val suivent ce schéma (fig. 8).

La teneur en Ser tombe rapidement et devient nulle dès le cinquième jour.

Acides aminés de la fraction protéique

Les pourcentages de décroissance de l'azote protéique après 5 et 9 jours de MA sont respectivement de 50 p. 100 et 63 p. 100.

De nombreux acides présentent une chute brutale dans les 4 à 5 premiers jours ; cette chute se poursuit à vitesse de plus en plus réduite. Il en est ainsi pour les courbes représentatives des acides Glu, Asp, Ile, Leu, Val, Ser, Gly, Phe, Tyr (fig. 9).

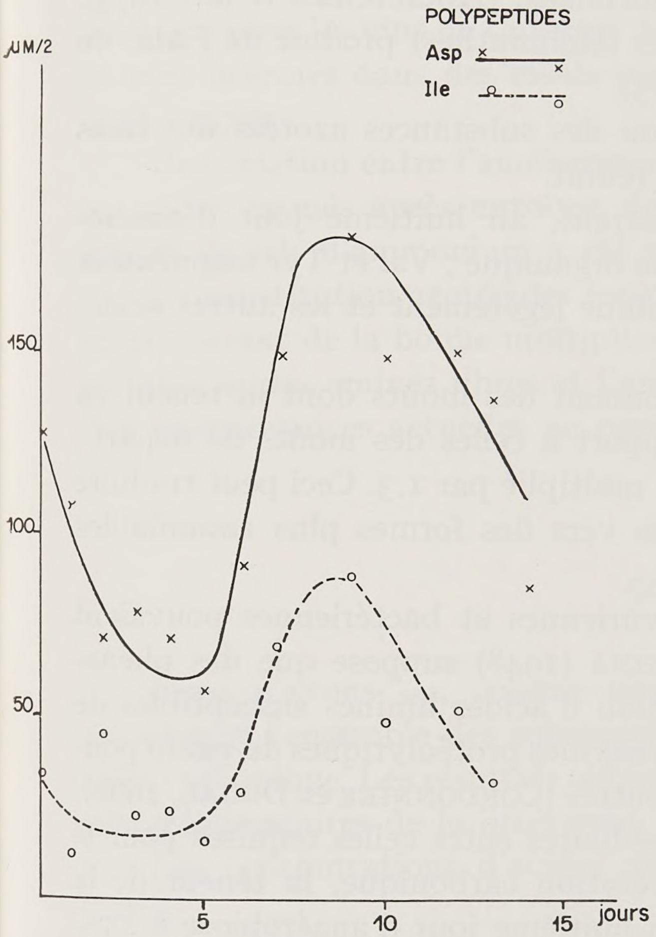


FIG. 8. — *Exemples d'évolution des teneurs en acides aminés engagés dans les polypeptides, au cours du métabolisme anaérobie, à 35°C. Acide aspartique et isoleucine*

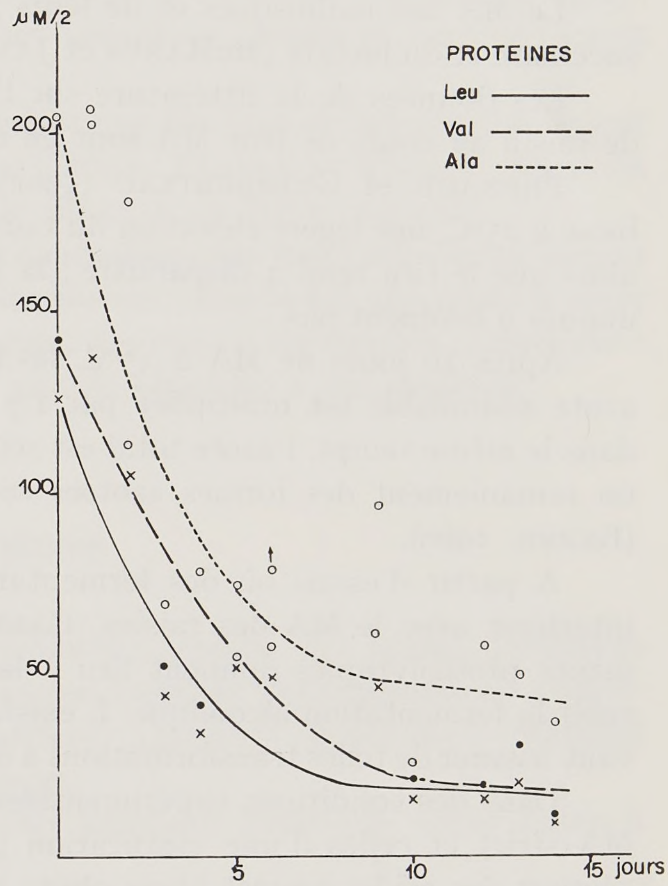


FIG. 9. — *Exemples d'évolution des teneurs en acides aminés engagés dans les protéines, au cours du métabolisme anaérobie, à 35°C. Leucine , valine et alanine*

DISCUSSION

Nos résultats sont, généralement, en accord avec ceux d'autres auteurs. Ainsi, l'accumulation d'acides aminés libres en situation d'anaérobiose est un phénomène habituel tant dans le règne végétal qu'animal.

Les feuilles de Kalanchoë, les racines de carotte et les coléoptiles d'avoine placés dans une atmosphère contenant de 20 à 90 p. 100 de dioxyde de carbone subissent un MA ; la « zymasis » carbonique provoque une élévation des teneurs en γAB et succinate ainsi qu'une diminution des quantités de Glu, Asp et Ala (RANSON, 1953).

Des concentrations élevées de dioxyde de carbone et faibles d'oxygène dans

l'atmosphère utilisée pour la culture des tissus végétaux (Sycomore, Rose, Haricot...) conduisent à une augmentation du stock d'acides aminés libres, particulièrement de γAB (WICKREMASINGHE, SWAIN et GOLDSTEIN, 1963).

Des modifications dans les proportions respectives d'acides aminés sont observées au cours de la conservation d'olives en vases clos (SAWAS-DIMOPOULOU et FYTISAS, 1967).

La formation d'alanine a été signalée durant l'anaérobiose de l'huître (HOCHACHKA et MUSTAFA, 1973). Les cellules des tissus musculaires de vertébrés marins en plongée fermentent Asp et Glu en Ala et succinate (HOCHACHKA *et al.*, 1973).

Le MA des mollusques et de leurs parasites (Helminthes) produit de l'Ala, du succinate et du lactate (MCMANUS et JAMES, 1975).

Les données de la littérature sur l'évolution des substances azotées des baies de raisin au cours de leur MA sont en nombre réduit.

PEYNAUD et GUIMBERTEAU (1962) enregistrent, au huitième jour d'anaérobiose à 25°C, une légère élévation du taux d'azote organique ; Val et Tyr augmentent alors que le Glu tend à disparaître ; la Pro diminue légèrement et les autres acides aminés n'évoluent pas.

Après 10 jours de MA à 35°C, les baies donnent des moûts dont la teneur en azote assimilable est multipliée par 1,7 par rapport à celles des moûts de départ ; dans le même temps, l'azote total est seulement multiplié par 1,3. Ceci peut traduire un remaniement des formes azotées condensées vers des formes plus assimilables (BARRE, 1969).

A partir d'essais où des fermentations levuriennes et bactériennes pouvaient interférer avec le MA des raisins, GARINO CANINA (1948) suppose que des phénomènes protéolytiques donnent lieu à la formation d'acides aminés susceptibles de subir la fermentation alcoolique. L'existence d'enzymes protéolytiques du raisin pouvant assurer de telles transformations a été démontrée (CORDONNIER et DUGAL, 1968).

Dans des conditions expérimentales intermédiaires entre celles requises pour le MA strict et celles d'une vinification par macération carbonique, la teneur de la plupart des acides aminés libres chute jusqu'au huitième jour d'anaérobiose à 25°C (POUX, communication personnelle).

A partir de toutes ces observations et de nos propres résultats, nous pouvons supposer qu'il existe effectivement, au cours du MA du raisin, une protéolyse relativement importante donnant des acides aminés libres et des polypeptides. Cette dernière forme d'utilisation de l'azote serait soumise à des phénomènes alternativement prédominants d'anabolisme et de catabolisme.

Abstraction faite des quantités de γAB, une phase de croissance de la teneur en azote pour la fraction « acides aminés libres » semble apparaître à partir du douzième jour de nos essais. Cette formation accrue d'acides aminés libres pourrait traduire une nouvelle étape dans la transformation de la baie durant le MA ; étape de désorganisation cellulaire accélérée, par exemple.

Certains acides tels le Glu, l'Asp, l'Ala sont, vraisemblablement, des plaques tournantes du MA (travaux en cours). Le γAB qui prend une grande part (30 p. 100) dans l'augmentation de l'azote aminé libre semble être, par la suite, catabolisé. Ses voies de synthèse et son devenir demeurent ignorés (travaux non publiés).

Les conséquences technologiques de telles évolutions risquent d'être importantes. En effet, les moûts issus par pressurage de baies ayant subi le MA constituent un

milieu favorable au développement des micro-organismes ; ils activent le déroulement de la fermentation alcoolique et le déclenchement de la fermentation malolactique (BARRE, 1973). En outre, la composition azotée des vins ainsi élaborés paraît être modifiée par rapport à celles de vins obtenus par des méthodes plus habituelles.

Les vins de *Gamay* de macération carbonique contiennent davantage d'azote total, d'acides aminés libres et moins de protéines que les vins de vendange foulée (BERGERET, FEUILLAT et KAMAL, 1971). Ces résultats sont confirmés, partiellement, pour les vins blancs de *Greco di Todi* (MONTEDORO, FANTOZZI et BERTUCCIOLI, 1974) ainsi que pour les vins de *Cabernet Sauvignon, Merlot* et *Pinot noir* (MUJDABA, 1971) ; ils sont infirmés dans des essais conduits sur *Sangiovese, Merlot* et *Canina* (AMATI *et al.*, 1973).

Une relation entre l'amélioration organoleptique des vins et leur enrichissement en acides aminés après autolyse des levures (POUX, FLANZY et FLANZY, 1964) ou apport de sels d'ammonium a été pressentie (FLANZY et POUX, 1965 *a*).

La constitution azotée des moûts après anaérobiose des baies est-elle un facteur prépondérant de la bonne multiplication microbienne ? Existe-t-il une relation entre certains acides aminés libres et l'arôme original des vins de macération carbonique ? Nos connaissances actuelles ne permettent pas de répondre à ces questions.

CONCLUSIONS

Nous n'avons pu, comme nous le souhaitons, établir des bilans quotidiens recouvrant l'ensemble des substances azotées des baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. Les résultats obtenus permettent, cependant, de préciser les données très fragmentaires de la littérature sur ce sujet.

Les concentrations d'acides aminés libres fluctuent fortement d'une année à l'autre.

Une réorganisation importante des formes d'azote dosées dans les baies de raisin a lieu au cours du métabolisme anaérobie. L'azote ammoniacal disparaît rapidement et presque totalement des baies. Les teneurs en protéines décroissent. Les polypeptides semblent subir un métabolisme très actif où dégradations et synthèses coexistent. La majorité des acides aminés libres présente une phase de croissance suivie d'un palier à partir du sixième au septième jour, à 35°C ; un classement en quatre groupes peut être effectué selon leur coefficient de variation durant le métabolisme anaérobie.

Des analogies d'évolution apparaissent pour certains acides aux trois températures considérées : 35°, 25° et 15°C.

A 35°C, après 9 jours d'anaérobiose, quatre acides prédominent quantitativement tant sous forme libre que sous forme de polypeptides : γ-aminobutyrate, proline, alanine et arginine.

De telles observations, en mettant en évidence des phénomènes simultanés de synthèses et de dégradations, peuvent permettre d'orienter de nouveaux travaux sur le métabolisme anaérobie du raisin en particulier et sur celui des fruits en général.

Ainsi, le choix de durées d'anaérobiose correspondantes à des évolutions carac-

téristiques des acides aminés devrait favoriser la mise en évidence d'interrelations entre eux et divers autres métabolites : glucose, produits de la fermentation intracellulaire, acides organiques...

La recherche des systèmes enzymatiques, vraisemblablement impliqués dans le métabolisme de ces acides aminés et des protéines, risque d'apporter des renseignements précieux pour une meilleure compréhension des phénomènes généraux du métabolisme anaérobie. Le parallèlisme entre l'évolution des fractions azotées, la fraction polypeptidique principalement, et les développements microbiens méritera d'être réétudié à la lumière des nouvelles données. Enfin, l'accumulation de certaines formes d'azote n'est-elle pas génératrice d'arômes caractéristiques ? Quelle serait la part prise par les micro-organismes dans cette conversion ?

Des études sur le métabolisme azoté des baies placées en atmosphère de dioxyde de carbone se justifient par leurs conséquences tant au niveau fondamental qu'au niveau appliqué. Elles peuvent apporter de nouvelles connaissances sur le métabolisme anaérobie des fruits après récolte et permettre ainsi une plus grande maîtrise de la conservation par atmosphère contrôlée. Elles peuvent orienter la conduite de la vinification par macération carbonique et, par là, améliorer certaines caractéristiques des vins élaborés selon cette méthode.

Reçu pour publication en mai 1976.

SUMMARY

EVOLUTION OF THE NITROGEN SUBSTANCES DURING THE ANAEROBIC METABOLISM OF GRAPE BERRIES

The changes of concentrations in free amino-acids, polypeptide and protein amino-acid were observed during the anaerobic metabolism of *Carignan* grape berries kept in darkness at 35°, 25° or 15°C.

The general evolution trends of the three nitrogen fraction and of ammonium were observed. Simultaneous phenomena of synthesis and degradation of the nitrogen substrates were noted.

These results as a whole allow to direct new researches towards the anaerobic metabolism of the fruits after vintaging and towards the wine-making with maceration in presence of carbon dioxide.

RESUMEN

EVOLUCIÓN DE LOS SUBSTRATOS NITROGENADOS DURANTE EL TRANSCURSO DEL METABOLISMO ANAEROBIO DE LA BAYA DE LA UVA

Los cambios de concentraciones de los ácidos aminados libres, de los ácidos aminados polipeptidíticos y de los ácidos aminados proteicos han podido ser seguidos durante el transcurso del metabolismo anaerobio de bayas de uva *Carignan* dispuestas — en la oscuridad — a 35°, 25° ó 15°.

Han sido observadas las formas generales de la evolución de las tres fracciones nitrogenadas y del amonio. Han sido registrados fenómenos simultáneos de síntesis y de de degradación de los substratos.

El conjunto de resultados logrados permite orientar las nuevas investigaciones acerca del metabolismo anaerobio de las frutas después de la cosecha y, asimismo, acerca de la vinificación por maceración carbónica.

RIASSUNTO

EVOLUZIONE DELLE SOSTANZE AZOTATE NEL CORSO DEL METABOLISMO ANAEROBICO DELLA BACCA D'UVA

Sono stati osservati i cambiamenti di concentrazione degli amminoacidi liberi, degli amminoacidi polipeptidici e degli amminoacidi proteici durante il metabolismo anaerobico delle bacche d'uva *Carignan* poste nell' oscurità a 35°, 25°, o 15°C.

Sono stati studiati i ritmi generali d'evoluzione delle tre frazioni azotate e dell'ammonio e sono rilevati dei fenomeni simultanei di sintesi e di degradazione dei substrati azotati.

L'insieme di questi risultati permette di orientare nuove ricerche sul metabolismo anaerobico delle bacche dopo raccolta e sulla vinificazione mediante macerazione carbonica.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AMATI A., DONATI A. M., GALASSI S., PALLOTTA U., 1973. Esperienze di vinificazione per macerazione carbonica di uve prodotte in Romagna. II. Caratteristiche chimiche e chimico-fisiche di vini Sangiovese, Merlot e Canina attenuti con macerazione carbonica. *Sci. e Tecnol. alimenti*, **3**, 357-361.

BARRE P., 1969. Rendement en levure des jus provenant de baies de raisins placées en atmosphère carbonique. *C. R. Ac. Agri.*, **55**, 1274-1277

BARRE P., 1973. In FLANZY M., ANDRÉ P., *La vinification par macération carbonique.* 29-30, S.E.I., C.N.R.A., Versailles.

BERGERET J., FEUILLAT M., KAMAL S., 1971. Recherches sur la vinification par « Macération carbonique » Expérimentation sur le *Gamay* en Côte-d'or (1970) *Journées Macération carbonique 10-11/II/1971. 195-203. I.N.R.A. Avignon.*

BIDAN P., 1975. Relation entre la teneur des vins en alcools supérieurs et la teneur des moûts en substances azotés en particulier en acides aminés. *Bull. O.I.V.*, **536**, 842-867.

CORDONNIER R., DUGAL A., 1968. Les activités protéolytiques du raisin. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 189-206.

FLANZY C., POUX Ch., 1965 *a*. Les levures alcooliques dans les vins. Protéolyse, protéogenèse (III). *Ann. Technol. agric.*, **14**, 35-48.

FLANZY C., POUX Ch., 1965 *b*. Note sur la teneur en acides aminés du moût de raisin et du vin en fonction des conditions de l'année (maturation et fermentation). *Ann. Technol. agric.*, **14**, 87-91.

FLANCY C., ANDRÉ P., FLANZY M., CHAMBROY Y., 1967. Variations quantitatives des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. I. Influence de la température. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 27-34. II. Influence de la durée d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 89-107.

FLANZY M., BENARD P., FLANZY C., SCHOBER A., 1969. Détermination du degré alcoolique de vins et de solutions hydro-alcooliques à faibles concentrations en éthanol au moyen du mélange sulfochromique. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 367-374.

FLANZY C., 1971. Évolution des acides organiques et des substances azotées des baies au cours de la fermentation intra-cellulaire du raisin. *Journées Macération carbonique. 10-11/II/1971-37-46. I.N.R.A., Avignon.*

FLANZY C., ANDRÉ P., BENARD P., BURET M., CHAMBROY Y., JOURET C., 1974. Fermentation intracellulaire des baies de raisin au cours de leur métabolisme anaérobie. *Ann. Technol. agric.*, **23**, 481-500.

GARINO-CANINA E., 1948. Fermentation vinaire avec des détails biochimiques du processus de la fermentation du moût de raisin. *Bull. O.I.V.*, **21**, 55-61

HOCHACHKA P. W., MUSTAFA T., 1973. Enzymes in facultative anaerobiosis of molluscs. I. Malic enzyme of oyster adductor muscle. *Comp. Bioch. Physiol.*, **45** B, 625-637. II. Basic catalytic properties of PEP carboxykinase in oyster adductor muscle. *Comp. Bioch. Physiol.*, **45** B, 639-655. III. PEP carboxykinase and its role in anaerobic transition. *Comp. Bioch. Physiol.*, **45** B, 657-667.

HOCHACHKA P. W., OWEN T. G., ALLEN J. F., WHITTOW G. C., 1975. Multiple end products of anaerobiosis in diving vertebrates. *Comp. Bioch. Physiol.*, **50** B, 17-22.

IUPAC-IUB, 1967. Abréviations et symboles pour les acides aminés, les peptides et leurs dérivés. Règles proposées. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **49**, 121-129.

JAULMES P., 1951. Analyse des vins, 223, 2e édition, Poulain, Montpellier.

MAC MANUS D. P., JAMES B. L., 1975. Anaerobic glucose metabolism in the digestive gland of *Littorina Saxatilis Rudis* (MATON) and in the daughter sporocysts of *Microphallus similis* (JÄG.) (*Digenea* : Microphallidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, **51** B, 293-297.

MOAT A. G., AHMAD F., 1965. Biosynthesis and interrelationships of amino acids in yeast. *Wallerstein Communications*, 111-130.

MONTEDORO G., FANTOZZI P., BERTUCCIOLI M., 1974. Essais de vinification de raisins blancs avec macération à basse température et macération carbonique. *Ann. Technol. agric.*, **23**, 75-95.

MUJDABA F., 1971. Qualité des vins en rapport avec la technique de vinification par macération carbonique. *10-11/II/1971-227-233. I.N.R.A., Avignon.*

PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G., 1962. Modification de la composition des raisins au cours de leur fermentation propre en anaérobiose. *Ann. Physiol. vég.*, **4**, 161-167.

POUX Ch., FLANZY C., FLANZY M., 1964. Les levures alcooliques dans les vins ; protéolyse et protéogenèse. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 5-18.

POUX Ch., 1969. Dosage enzymatique de l'acide L(-) malique. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 359-366.

POUX Ch., OURNAC A., 1970. Acides aminés libres et polypeptidiques du vin. *Ann. Technol. agric.*, **19**, 217-237.

RANSON S. L., 1953. Zymasis and acid metabolism in higher plant. *Nature*, **172**, 252-253.

SAWAS-DIMOPOULOU C., FYTISAS E., 1967. Accumulation des acides aminés libres dans le mésocarpe de l'olive après conservation à basse température. *Can. J. Biochem.*, **45**, 1965-1971.

SPACKMANN D. H., STEIN W. H., MOORE S., 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Anal. chem.*, **30**, 1190-1206.

WICKREMASINGHE R. L., SWAIN T., GOLDSTEIN J. L., 1963. Accumulation of amino-acids in plant cell tissue cultures. *Nature*, **199**, 1302-1303.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (2), 191-202.

APPAREIL POUR LE DOSAGE CONDUCTIMÉTRIQUE DU GAZ CARBONIQUE DÉGAGÉ PAR DES ORGANES VÉGÉTAUX

Y. CHAMBROY, M. BURET et C. FLANZY

avec la collaboration technique de A. MOUNITION et Françoise PASCAL

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,
84140 Montfavet

RÉSUMÉ

Pour compléter la mesure de l'intensité respiratoire définie par la consommation d'oxygène, un appareil original a été mis au point pour la mesure du CO_2 dégagé par les végétaux.

Le principe du dosage est basé sur la mesure de la variation de conductivité de la solution alcaline piégeant le CO_2 dégagé.

L'appareil est un conductimètre avec remise à l'équilibre automatique du pont de mesure. L'enregistrement des variations de résistance nécessaires pour la remise à l'équilibre permet de suivre l'amplitude et la cinétique du dégagement de CO_2.

D'autres applications de ce conductimètre sont citées.

Mots clés : *quotient respiratoire, dosage automatique, gaz carbonique, conductimétrie.*

I. — INTRODUCTION

L'intensité respiratoire d'organes végétaux peut être connue par la mesure de l'oxygène consommé ou du gaz carbonique produit. Si les techniques permettant de connaître l'un de ces deux paramètres sont relativement nombreuses, celles donnant simultanément les quantités d'oxygène absorbées et de gaz carbonique dégagées sont plus rares. L'intérêt de ces dernières réside dans le fait qu'elles permettent le calcul du quotient respiratoire.

Une technique de mesure volumétrique de l'oxygène consommé a été décrite (CHAMBROY, FERRY, FLANZY, 1970). Nous avons cherché à compléter l'appareil utilisé en lui adjoignant un dispositif permettant le dosage du gaz carbonique dégagé.

La méthode de dosage doit permettre l'élimination du CO_2 de l'atmosphère de l'enceinte réactionnelle afin de maintenir l'échantillon végétal dans une atmosphère de composition sensiblement constante au cours de la mesure.

L'une des techniques les plus simples consiste à piéger en continu le gaz carbonique dans une solution alcaline dont on mesure la conductivité (CHARLOT, 1966 *a*). Nous avons conçu un conductimètre dont les caractéristiques ont été choisies pour permettre la mesure de l'amplitude et de la vitesse du dégagement de gaz carbonique produit par la respiration d'organes végétaux.

II. — PRINCIPE DU DOSAGE

1. — *Rappels*

Tout ion I de charge Z_i dont la concentration en ion-gramme par litre est C_i participe à la conductivité d'une solution par la valeur $\lambda_i Z_i C_i$, le coefficient λ_i étant la conductivité équivalente de l'ion. En première approximation, les conductivités dues aux différents ions sont additives, la conductivité de la solution est donnée par $\Lambda = \Sigma\, \lambda_i Z_i C_i$ (CHARLOT, 1966 *b*).

En pratique, on mesure la conductance $\frac{1}{R}$ de la solution entre deux plaques de platine platiné, de surface s, distantes entre elles de e ; en appliquant la loi d'Ohm, on obtient :

$\frac{1}{R} = \chi \frac{s}{e}$, χ étant appelé conductivité spécifique de la solution ; en posant $\frac{e}{s} = K$ constante de la cellule de mesure, il vient $\frac{1}{R} = \frac{\chi}{K}$.

2. — *Applications à la détection de la carbonatation de la soude*

Le gaz carbonique réagit avec la soude pour donner du carbonate de sodium. Cette réaction correspond à la neutralisation d'une base forte, la soude, par un acide faible, l'acide carbonique :

$$CO_2 + 2\,OH^- \rightarrow CO_3^{=} + H_2O \qquad (1)$$

Lorsque toute la soude a été carbonatée, le gaz carbonique supplémentaire transforme ce carbonate en bicarbonate (JAULMES, 1965).

$$CO_3^{=} + CO_2 + H_2O \rightarrow 2\,CO_3H^- \qquad (2)$$

Au début de la carbonatation, réaction 1, coexistent des ions Na^+ ($\lambda = 50{,}1$) et des ions OH^- ($\lambda = 196{,}6$). Ces derniers sont progressivement remplacés par des ions $CO_3^{=}$ ($\lambda = 69{,}5$). La conductivité Λ de la solution diminue rapidement jusqu'à la neutralisation totale de la soude.

Au cours de la réaction 2, les ions $CO_3^{=}$ sont remplacés par des ions CO_3H^- ($\lambda = 44{,}5$) : la conductivité va continuer à diminuer mais beaucoup plus lentement.

La variation de conductivité de la soude, mesurée par la variation de sa conductance, nous indique donc la carbonatation progressive de celle-ci. Cette variation

étant plus importante lors de la réaction 1, la sensibilité de la mesure sera meilleure dans cette zone. La mesure de la conductance peut ainsi être reliée au dégagement de gaz carbonique émis par un organe végétal.

III. — DESCRIPTION DE L'APPAREIL

Cet appareil doit permettre de suivre le dégagement de CO_2 au cours de la respiration des végétaux. Il doit donc mesurer, d'une manière automatique, la carbonatation progressive de la soude et enregistrer la cinétique de cette carbonatation.

1. — *Système de détection*

La conductance $\frac{1}{R}$ de la soude est déterminée à l'aide d'une cellule de mesure conductimétrique placée dans l'une des branches d'un pont de Wheatstone dont le montage classique a été modifié en plaçant la résistance variable R_4 dans la branche comportant la cellule conductimétrique (fig. 1).

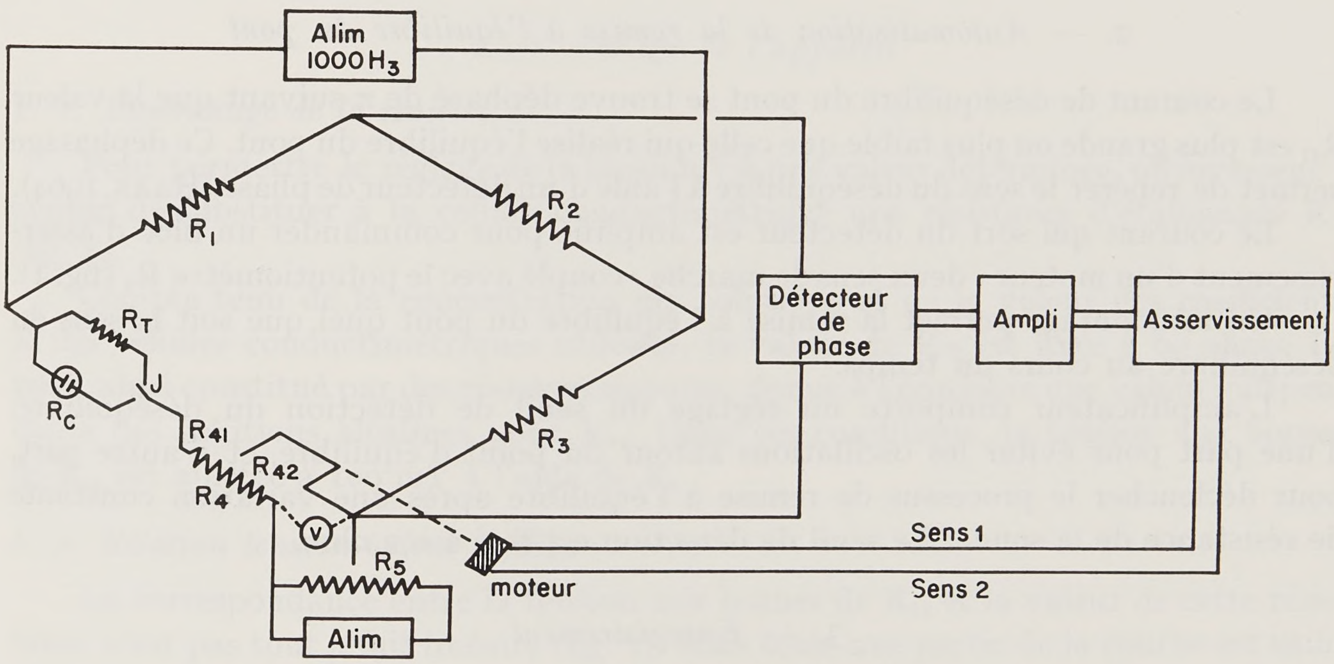


FIG. 1. — *Schéma d'ensemble du circuit*

Au cours de la carbonatation, la valeur de R_c varie et le pont est rééquilibré en agissant sur R_4 dont seule la partie R_{41} se trouve dans la branche du pont (fig. 1).

Les résistances R_1, R_2 et R_3 étant fixes, la branche du pont contenant R_c conserve une valeur constante.

$$R_c + R_{41} = R_3 \frac{R_1}{R_2} = \text{cte}$$

Ce pont, dont les quatre branches ont des valeurs constantes, a une sensibilité constante ; celle-ci est maximale lorsque les quatre branches sont identiques (LOISELEUR, 1963). Nous avons donc choisi pour R_1, R_2 et R_3 la même valeur de résistance.

Des essais préliminaires nous ont permis de définir une concentration de soude compatible avec les deux exigences suivantes :

— obtention d'une variation assez importante de la conductivité de la solution au cours de sa carbonatation, donc concentration assez faible, pour obtenir une meilleure précision du dosage.

— choix du titre de cette solution assez élevé pour permettre l'absorption d'une quantité de CO_2 correspondant à une expérimentation de quelques heures sans qu'il soit nécessaire d'augmenter exagérément le volume de cette solution.

Ces deux conditions contradictoires ont pu être conciliées, pour le type d'analyses que nous voulions effectuer, en choisissant pour les solutions de soude une gamme de concentration allant de 1/10 à 1/5 normale.

En fonction de ces données, la valeur des résistances R_1, R_2 et R_3 ainsi que celle de la résistance R_4 (potentiomètre 10 tours) a été fixée à 100 ohms.

La solution alcaline étant très conductrice, l'alimentation du pont par un courant de fréquence 1 000 Hz évite le phénomène de polarisation des électrodes.

Pour obtenir une mesure représentative de la conductance, la solution alcaline est, d'une part, maintenue à température constante à l'aide d'un bain-marie thermostaté et, d'autre part, soumise à une agitation efficace pour avoir une bonne homogénéité.

2. — *Automatisation de la remise à l'équilibre du pont*

Le courant de déséquilibre du pont se trouve déphasé de π suivant que la valeur R_{41} est plus grande ou plus faible que celle qui réalise l'équilibre du pont. Ce déphasage permet de repérer le sens du déséquilibre à l'aide d'un détecteur de phase (HAAS, 1964).

Le courant qui sort du détecteur est amplifié pour commander un bloc d'asservissement d'un moteur « deux sens de marche » couplé avec le potentiomètre R_4 (fig. 1).

Un tel montage permet la remise à l'équilibre du pont quel que soit le sens du déséquilibre au cours du temps.

L'amplificateur comporte un réglage du seuil de détection du déséquilibre, d'une part pour éviter les oscillations autour du point d'équilibre, et d'autre part, pour déclencher le processus de remise à l'équilibre après une variation constante de résistance de la soude. Le seuil de détection est fixé à 0,2 ohm.

3. — *Enregistrement*

La mesure du dégagement de CO_2 par le phénomène de carbonatation de la soude consiste donc à suivre les variations de résistance du potentiomètre R_4.

Nous ne pouvons mesurer directement la valeur R_{41}, toute intervention sur le pont risquant de modifier son équilibre. Par contre, la résistance R_{42} ne fait pas partie du pont ; elle peut donc faire partie d'un autre circuit permettant de mesurer sa valeur. D'après les caractéristiques du pont définies précédemment, nous avons :

$$R_c + R_{41} = R_3 \frac{R_1}{R_2} = 100\ \Omega.$$

Comme

$$R_{41} + R_{42} = R_4 = 100\ \Omega,$$

nous avons $R_c = R_{42}$

La mesure de la valeur de résistance R_{42} correspond donc, grâce aux caractéristiques du pont, à une mesure de la valeur R_c. Cette valeur R_c correspond, au coefficient K de cellule près, à la résistance de la solution $\left(\frac{1}{R} = \frac{\chi}{K}\right)$

La résistance R_{42} fait partie d'un circuit parcouru par un courant continu provenant d'une alimentation stabilisée (fig. 1) ; une résistance variable R_5 permet d'ajuster la tension aux bornes de R_{42} à une valeur déterminée pour une résistance définie de R_{42}.

Les variations de résistance de R_c vont se traduire par des variations de résistance de R_{42}, donc des variations de tension V aux bornes de cette résistance. Cette tension est mesurée par un potentiomètre enregistreur à déroulement de papier : un tel système permet de mesurer l'amplitude et la cinétique des variations de tension et de suivre ainsi la carbonatation progressive de la soude.

Un autre système d'enregistrement, plus onéreux, est réalisable : un voltmètre numérique mesure cette tension V et transmet sa valeur par un signal codé à une imprimante ; celle-ci reçoit à intervalles de temps réguliers un signal déclenchant l'impression.

IV. — DISCUSSION

1. — *Tarage de l'appareil*

1. 1. *Étalonnage de la tension.*

Pour permettre le réglage de la tension V à une valeur déterminée, un inverseur J permet de substituer à la cellule conductimétrique une résistance d'étalonnage R_T (fig. 1).

Compte tenu de la concentration des solutions et de la valeur des coefficients K des cellules conductimétriques utilisées, la valeur de R_T est fixée à 60 ohms. Le pont, ainsi constitué par des résistances pures, donne à l'équilibre une valeur indépendante des solutions alcalines pour R_{42}. Dans ces conditions, la tension aux bornes de R_{42} est ajustée à 100 mV à l'aide de R_5.

1. 2. *Relation tension-valeur de R_{42}.*

La correspondance entre la tension aux bornes de R_{42} et la valeur de cette résistance n'est pas tout à fait linéaire (fig. 2). Mais seule une partie de la courbe est utilisable lors des expérimentations (partie hachurée). Nous pouvons donc confondre cette partie de la courbe avec une droite. Comme la relation : quantité de CO_2 piégé — résistance de la solution fait intervenir la conductance $\frac{1}{R_c}$, la relation $\frac{1}{R_{42}} = f\left(\frac{1}{V}\right)$ est pratiquement linéaire.

Pour tous les calculs, nous pouvons donc prendre la valeur de la tension V comme mesure représentative de la résistance R_{42}, donc de la résistance R_c.

1. 3. *Fidélité de l'appareillage.*

1. 3.1. *Fidélité de l'appareil.*

Nous avons vérifié la correspondance entre la valeur de R_c et celle de R_{42}. Pour cela, nous remplaçons la cellule conductimétrique par une boîte de résistance étalon.

Pour chaque valeur de ces résistances, après rééquilibrage du pont, nous mesurons la valeur de R_{42} à l'aide d'un ohm-mètre au 1/100 d'ohm. La correspondance entre R_c et R_{42} est excellente (écart inférieur à 0,2 ohm) ; pour cela, il faut impérativement avoir des valeurs identiques pour R_1 et R_2 d'une part et R_3 et R_4 d'autre part.

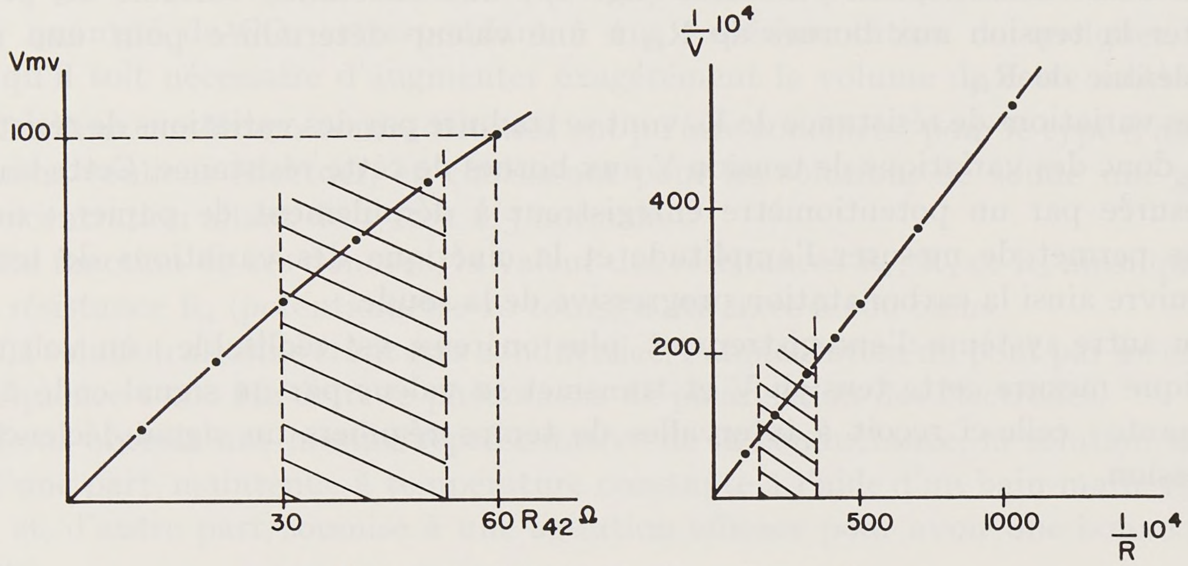


FIG. 2. — *Relation tension-résistance R_{42}*
(partie hachurée : zone d'utilisation expérimentale)

1. 3.2. *Fidélité des mesures.*

Des mesures consécutives de la résistance d'une solution de soude nous donnent une variation de la tension V de 0,2 mV autour de la valeur moyenne. Cette valeur étant de l'ordre de grandeur de celle du seuil de détection, nous pouvons considérer que l'appareil est satisfaisant pour obtenir une bonne répétabilité des mesures.

2. — *Courbe d'étalonnage du dégagement de CO_2*

2. 1. *Courbe expérimentale.*

Nous avons tracé expérimentalement la courbe donnant la relation entre la conductance de la solution alcaline et la quantité de gaz carbonique absorbé.

2. 1.1. *Appareillage.*

Un dispositif de distribution de CO_2 par quantité unitaire constante (fig. 3) est branché en série avec un barboteur à soude et une pompe péristaltique ; l'ensemble est maintenu à une température θ constante grâce à un bain-marie thermostaté.

Une enceinte B contient du gaz carbonique à la pression atmosphérique et à la température de l'expérience.

L'ampoule A, initialement pleine d'eau, est remplie par un volume v de CO_2 provenant de B ; ceci est obtenu en prélevant grâce à la seringue S un volume v d'eau dans A et en le refoulant dans B, les vannes V_1, V_2 et V_3 (robinets 3 branches, 2 voies) étant convenablement positionnées.

La seringue prélève un volume v d'eau dans la réserve D et l'injecte dans A, refoulant le CO_2 dans le circuit de piégeage.

Finalement, l'opération a consisté à prélever dans B un volume v de CO_2 et à

le remplacer par le même volume d'eau : la pression à l'intérieur de B n'a donc pas varié. Le barbotage se fait en circuit fermé : le CO_2 est donc entièrement absorbé par la soude.

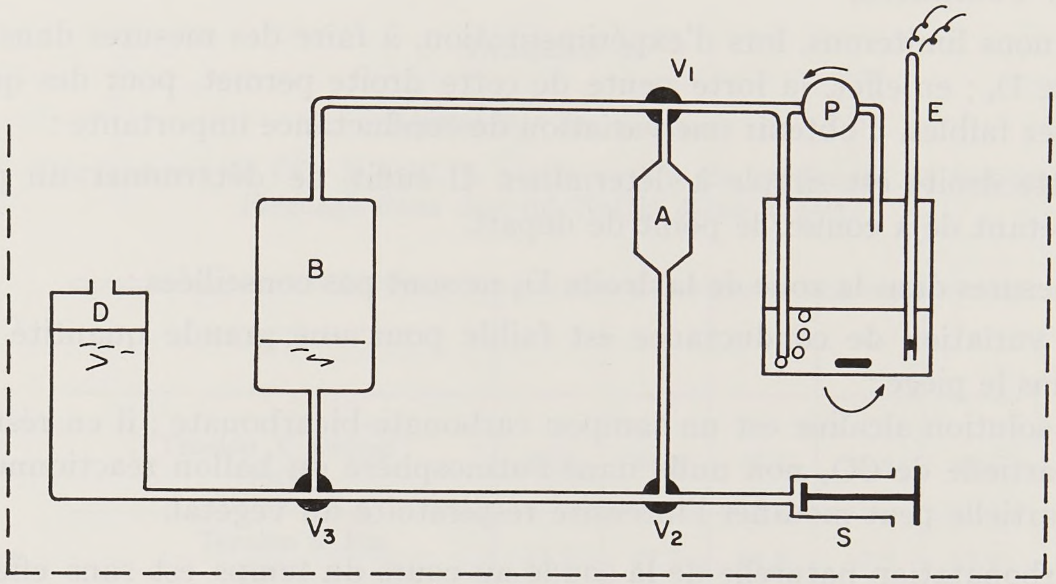


FIG. 3. — *Dispositif permettant le tracé, point par point de la courbe : CO_2 absorbé-tension aux bornes de R_{42}*

B ballon contenant le CO_2
D réserve d'eau
V_1, V_2, V_3 robinets 3 branches, 2 voies
P pompe
S seringue
BM bain-marie thermostaté
E électrode conductimétrique

2. 1.2. *Résultats.*

La courbe expérimentale tracée point par point correspond bien à la théorie (§ 1.2).

La conductance $\left(\text{mesurée par } \frac{1}{V}\right)$ est une fonction linéaire du volume de CO_2 absorbé jusqu'aux environs de la transformation complète de la soude en carbonate (fig. 4). Cette droite, D_1, possède une pente élevée. De part et d'autre du point de

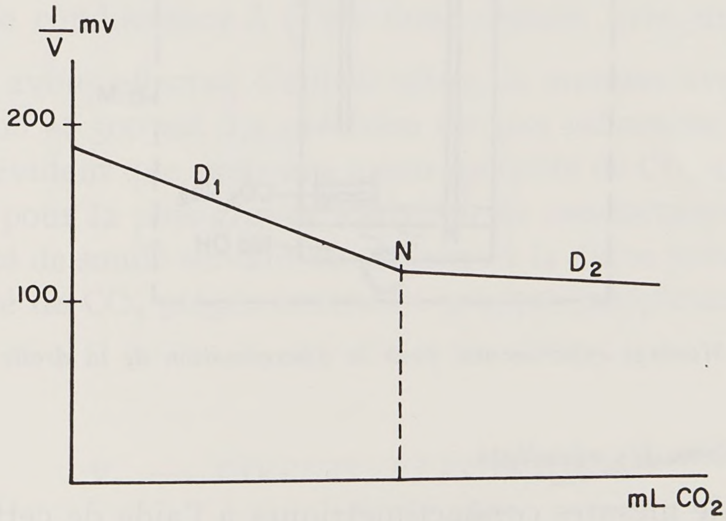


FIG. 4. — *Variation de la conductivité en fonction de la quantité de CO_2 absorbé*

neutralisation N, la courbe s'infléchit progressivement puis prend une allure linéaire (D_2) avec une pente beaucoup plus faible : le CO_2 ajouté transforme le carbonate en bicarbonate.

2. 1.3. *Conclusion.*

Nous nous limiterons, lors d'expérimentation, à faire des mesures dans la zone de la droite D_1 ; en effet, la forte pente de cette droite permet, pour des quantités de CO_2 assez faibles, d'obtenir une variation de conductance importante :

— cette droite est simple à déterminer. Il suffit de déterminer un point, le deuxième étant déjà connu, le point de départ.

Les mesures dans la zone de la droite D_2 ne sont pas conseillées :

— la variation de conductance est faible pour une grande quantité de CO_2 ajoutée dans le piège ;

— la solution alcaline est un tampon carbonate-bicarbonate ; il en résulte une pression partielle de CO_2 non nulle dans l'atmosphère du ballon réactionnel. Cette pression partielle peut modifier l'intensité respiratoire du végétal.

La carbonatation naturelle de la soude au cours du temps est sans effet sur la pente de la droite D_1 ; seule varie la valeur de la conductance du point de départ : il y a décalage du point d'origine. Pour une solution de soude donnée, il suffit donc de faire une seule courbe d'étalonnage ; seule est diminuée, du fait de la carbonatation naturelle, la quantité de CO_2 pouvant être piégée jusqu'au point N.

2. 2. *Courbe d'étalonnage.*

Pour obtenir un point expérimental de la droite D_1, il suffit de faire dégager une certaine quantité de gaz carbonique, inférieure à la quantité correspondant au point N, à partir d'une solution de carbonate de sodium de titre connu par de l'acide sulfurique concentré et de la faire absorber par la solution alcaline contenue dans un récipient étanche placé dans un bain-marie thermostaté.

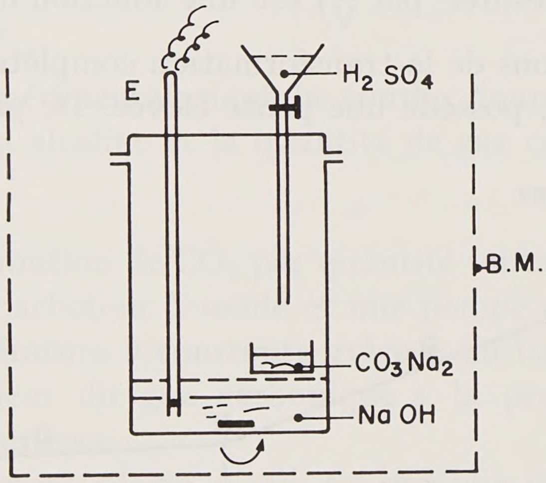


FIG. 5. — *Montage expérimental pour la détermination de la droite d'étalonnage*

2. 2.2. *Précisions des résultats.*

La répétition de mesures conductimétriques à l'aide de cette technique permet de calculer une valeur moyenne de la conductance et la précision avec laquelle elle

est connue (d'après LACROIX, 1963). Sur cinq répétitions, en piégeant le CO_2 dégagé à partir de 1 g de carbonate de sodium à 35°C dans 200 ml de soude N/10, nous obtenons les résultats suivants (tabl. 1).

TABLEAU I

Répétabilité des mesures

Dégagement de CO_2 à 35°C, à partir de 1 g de carbonate de sodium.
Piégeage dans 200 ml NaOH N/10 à 35°C

N° de l'essai	1	2	3	4	5
Tension V Départ (mV)	35,8	35,8	35,8	35,3	35,6
Tension V Fin (mV)	47,7	47,7	48,3	47,9	47,9
$\Delta \frac{1}{V} \times 10^4$	69	69	72	72	72

Moyenne de $\Delta \frac{1}{V} 10^4 : \bar{x} = 71,2$.

Écart-type de la distribution : $\sigma = 2,17$.

Intervalle de confiance (à 5 p. 100) pour une mesure isolée : $\sigma t = \pm 6,01$.

Précision sur une mesure isolée : $P_1 = \frac{\sigma t}{\bar{x}} = \pm 8$ p. 100.

Intervalle de confiance (à 5 p. 100) de la moyenne calculée sur 5 mesures

$$\sigma mt = \frac{\sigma t}{\sqrt{5}} = \pm 2,7$$

Précision sur la moyenne des mesures : $P_2 = \frac{\sigma mt}{\bar{x}} = 3,7$ p. 100.

La variation de conductance $\Delta \frac{1}{V}$ est donc connue avec une bonne précision ($\pm$ 4 p. 100). Nous avons effectué d'autres séries de mesures avec des quantités de soude différentes, 100 et 300 ml. La précision est peu influencée par la quantité de soude; mais il reste évident que, pour une même quantité de CO_2 absorbé, la précision peut être meilleure pour la plus grande variation de conductance : il est nécessaire d'adapter la quantité de soude servant au piégeage à la durée prévue de l'expérience, pour que la quantité de CO_2 piégée neutralise presque complètement la soude.

V. — CIRCUIT ÉLECTRIQUE

Voir figure 6 page suivante.

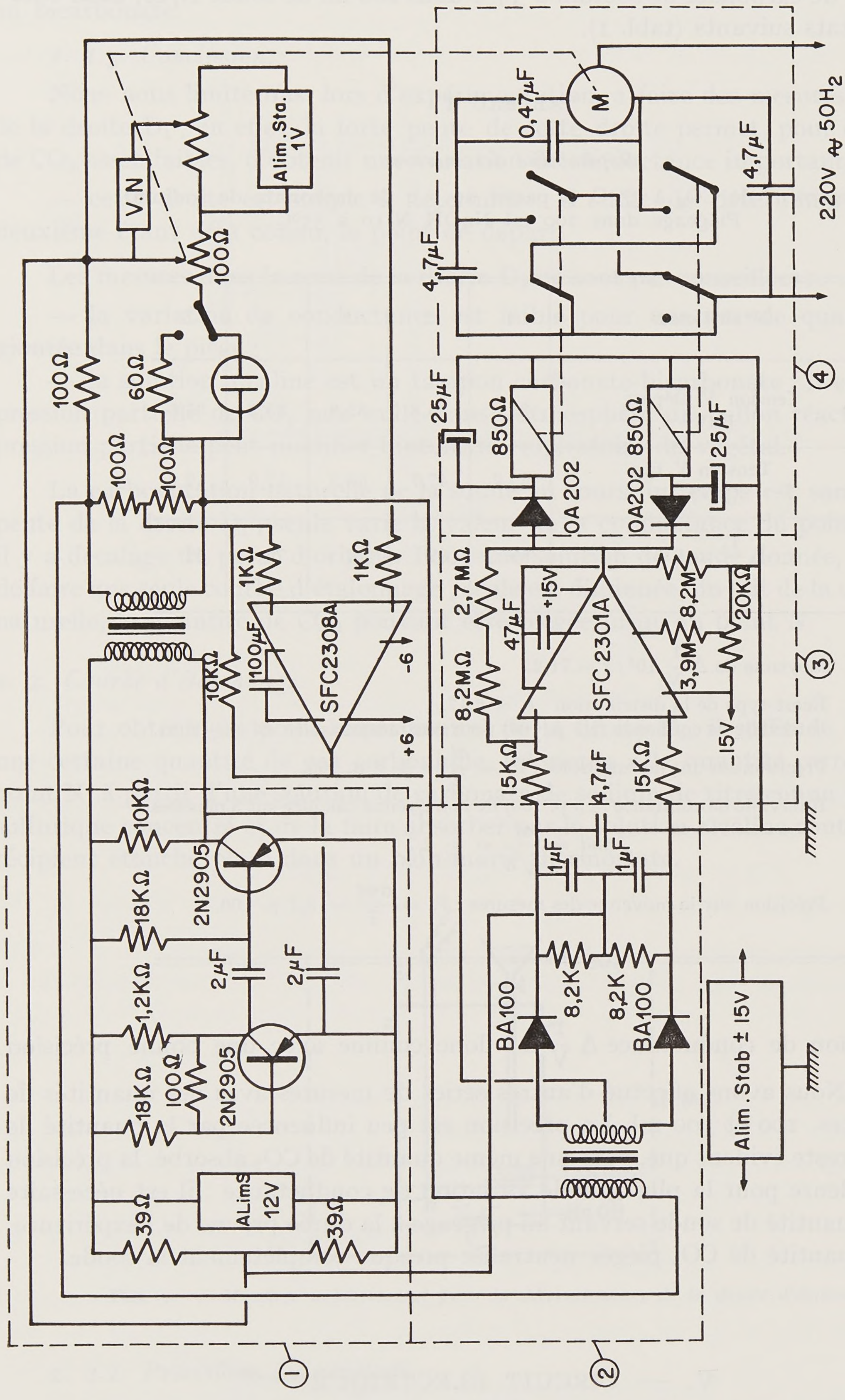


Fig. 6. — *Schéma électronique*

1. Oscillateur
2. Détecteur de phase
3. Amplificateur
4. Asservissement

VI. — CONCLUSIONS

Le gaz carbonique dégagé par les végétaux au cours de leur respiration peut être dosé par la mesure conductimétrique de la carbonatation d'une solution de soude.

L'appareillage mis en œuvre pour suivre cette carbonatation comporte un montage permettant la mesure automatique en continu de la conductance de la solution alcaline et un système d'enregistrement servant à suivre la cinétique du dégagement de CO_2.

Seules les variations de conductance servant au calcul de la quantité de CO_2, il n'est pas nécessaire d'employer des cellules conductimétriques étalonnées. Par ailleurs, la carbonatation naturelle, au cours du temps, de la solution alcaline n'affecte pas les mesures ; la pente de la droite d'étalonnage reste la même, il y a simplement translation de cette droite.

Cet appareil, mis au point pour travailler dans des conditions particulières, peut servir à d'autres mesures conductimétriques :

— travailler dans une plage de conductance différente par changement des quatre résistances R_1, R_2, R_3 et R_4 ;

— travailler en différentiel par remplacement de la résistance R_3 par une cellule de mesure conductimétrique identique à R_c.

Reçu pour publication en juin 1976.

SUMMARY

DEVICE DESIGNED FOR THE CONDUCTIMETRIC MEASUREMENT OF THE CO_2 EMITTED BY PLANT ORGANS

To complete the measurement of the respiratory intensity defined by the oxygen comsumption an original device was developed to measure the CO_2 emitted by plant organs.

The principle of the measurement mainly consists in determining the variation in the conductivity of the alkaline solution absorbing the CO_2 emitted.

The device is a conductimeter with an automatic balancing of the measuring bridge. The registering of the resistance variations necessary for the balancing allows to follow the range and kinetics of the CO_2 emission.

Other possible uses of this conductimeter are quoted.

RESUMEN

APARATO PARA LA DOSIFICACIÓN CONDUCTIMÉTRICA DEL GAS CARBÓNICO DESPRENDIDO POR LOS ÓRGANOS VEGETALES

Para completar la medición de la intensidad respiratoria definida por el consumo de oxígeno, ha sido creado un aparato original, para la medición del CO_2 desprendido por los vegetales.

El principio de la dosificación se funda en la medición de la variación de conductividad de la solución alcalina que capta el CO_2 desprendido.

El aparato es un conductímetro con puesta en equilibrio de forma automática del puente de medición. El registrador de las variaciones de resistencia necesarias para la puesta en equilibrio, permite seguir la amplitud y la cinética del desprendimiento del CO_2.

Se mencionan en este artículo otras aplicaciones de este conductímetro.

RIASSUNTO

APPARECCHIO PER IL DOSAGGIO CONDUTTOMETRICO DEL GAS CARBONICO LIBERATO DAGLI ORGANI VEGETALI

Per completare la misura dell'intensità respiratoria definita dal consumo d'ossigeno è stato messo a punto un apparecchio originale per misurare il CO_2 liberato dai vegetali.

Il principio del dosaggio è basato sulla misura della variazione di conducibilità della soluzione alcalina che trattiene il CO_2 liberato.

L'apparecchio è un conduttimetro con rimessa automatica in equilibrio del ponte di misura. La registrazione delle variazioni di resistenza necessarie per la rimessa in equilibrio permette di seguire l'ampiezza e la cinetica della liberazione di CO_2.

Sono citate altre applicazioni di questo conduttimetro.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAMBROY Y., FERRY P., FLANZY C., 1970. Appareil pour la mesure automatique et l'étude cinétique des échanges d'un gaz à pression et température constantes. *Ann. Technol. agric.*, **19**, 205-216.

CHARLOT G., 1966 *a*. *Les méthodes de la chimie analytique*, 669, 5e édition, Masson et Cie, Paris.

CHARLOT G., 1966 *b*. *Les méthodes de la chimie analytique*, 431-433, 5e édition, Masson et Cie, Paris.

HAAS A., 1964. *Mesures élecroniques*, 89-90. Éditions Radio, Paris.

JAULMES P., 1965. *Précis de chimie analytique*, **1**, 16, Masson et Cie, Paris.

LACROIX Y., 1963. Le calcul statistique au laboratoire d'analyse. *Bull. Soc. chim. France*, 892-898.

LOISELEUR J., 1963. *Techniques de laboratoire*, tome 1, 298, Masson et Cie, Paris.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (2), 203-216.

MISE AU POINT

LES ALBUMINES ET GLOBULINES DU BLÉ

P. FEILLET

Laboratoire de Technologie des Blés durs et du Riz, I. N. R. A., Centre de Recherches de Montpellier, E. N. S. A., I. N. R. A., 34060 Montpellier

INTRODUCTION

Dans une étude qui demeure à l'origine de très nombreux travaux ultérieurs que BOURDET (1956) a longuement rapportés et discutés, OSBORNE (1907) a proposé de classer les protéines du blé en fonction de leur solubilité dans l'eau, les solutions salines, l'éthanol aqueux et les solutions basiques. Bien que l'on sache depuis OLSON (1914) que les gliadines sont hydrosolubles et qu'il n'est donc pas possible de définir les constituants protéiques des blés sur les seuls critères de leur solubilité — particulièrement significatifs à cet égard sont les résultats de BAUDET et MOSSÉ (1962) — il est toujours admis de distinguer 4 groupes protéiques dans le blé :

— les albumines, solubles dans l'eau ;
— les globulines, solubles dans NaCl 0,5 M ;
— les gliadines, solubles dans l'éthanol 70 p. 100 ;
— les gluténines, protéines résiduelles après extraction des groupes précédents.

Les albumines et globulines, protéines cytoplasmiques, sont souvent regroupées sous le terme « protéines solubles » ; les gliadines et gluténines, protéines de réserve, constituent les fractions essentielles du gluten.

Les protéines solubles du blé ont été l'objet d'un nombre particulièrement important de travaux au cours des cinq dernières années, de sorte que les revues déjà anciennes de FEILLET (1967) ou même plus récentes de KASARDA *et al.* (1971) nous ont semblé devoir être actualisées. C'est ce que nous avons tenté de faire ici. Chaque fois que cela a paru nécessaire à la clarté de l'exposé, nous avons rapidement résumé les principaux résultats déjà rapportés précédemment (FEILLET, 1967).

Cette mise au point est divisée en cinq parties :

— conditions d'extraction ;
— importance quantitative ;
— fractionnement et purification ;
— propriétés physico-chimiques ;
— importance technologique.

Les propriétés enzymatiques de ces protéines ne seront pas abordées.

I. — CONDITIONS D'EXTRACTION

Le principe général d'extraction des albumines et des globulines est le suivant : la farine est mise en suspension dans une solution saline tamponnée vers pH = 7,0 ; après agitation et centrifugation, l'extraction est répétée plusieurs fois. Les fractions solubles réunies contiennent les protéines solubles ; les albumines sont séparées des globulines par dialyse contre l'eau distillée.

Les conditions de solubilisation des protéines solubles diffèrent dans d'assez larges limites d'un auteur à l'autre : le rapport farine/solvant est compris entre 1/2 (COATES et SIMMONDS, 1961) et 1/8,7 (PENCE et ELDER, 1953) ; la durée et le nombre des extractions varient respectivement de 30 minutes (PENCE et ELDER, 1953) à 5 heures (KAMINSKI, 1962) et de une (KELLEY et KOENIG, 1962) à quatre (COATES et SIMMONDS, 1961). L'agitation est généralement douce, une extraction trop énergique solubilisant une quantité non négligeable de gliadine (FEILLET, 1965). SHUEY et GILLES (1973) préconisent d'utiliser un agitateur à peinture et d'éliminer l'air des flacons avant agitation ; ils évitent ainsi la formation de mousse et réduisent au minimum la dénaturation des protéines. Le traitement retenu est suffisamment violent pour extraire la totalité des protéines solubles dans l'eau ; il est assez court (10 minutes) pour éviter le développement des activités enzymatiques.

Certains auteurs conseillent de délipider préalablement les farines de manière à faciliter la clarification des extraits (COATES et SIMMONDS, 1961) ; les composés phénoliques, particulièrement étudiés chez l'orge (CHAPON *et al.*, 1961), semblent également agir sur la stabilité des extraits salins qui précipitent partiellement au cours du stockage à 4°C ; contrairement aux observations de BARRE (1951) sur les protéines de l'amande, les ions phytiques ne s'associeraient pas aux protéines solubles du blé (BOURDET et FEILLET, 1967).

Une méthode de solubilisation des protéines sur colonne a été proposée par BODO (1961) et MAES (1962) : la technique consiste à mélanger la farine à un support inerte très divisé et à soumettre l'ensemble à une percolation par les solvants retenus. MOSSÉ *et al.* (1964) solubilisent ainsi par l'eau la moitié des protéines de la farine de blé ; il s'opère un fractionnement au cours de cette extraction ; d'après BAUDET *et al.* (1965), la dissolution de la deuxième fraction — de nature gliadine — serait due à la disparition de l'acide phytique par hydrolyse et à l'élimination des phosphates.

Probablement liée aux lipides de la farine, la *purothionine* — protéine soluble de type globuline (NIMMO *et al.*, 1968) — possède des propriétés tout à fait remarquables qui rendent possible son extraction par l'éther de pétrole ; elle est ensuite purifiée par l'éthanol acide, puis cristallisée dans l'éthanol à 90 p. 100 (BALLS *et al.*, 1942).

II. — IMPORTANCE QUANTITATIVE DES PROTÉINES SOLUBLES

La teneur en protéines solubles du blé varie avec la nature des échantillons analysés et les conditions d'extraction utilisées.

Selon PENCE *et al.* (1954), les protéines solubles représentent 17 p. 100 en moyenne des protéines totales ; la teneur en albumines (9,1 p. 100) est supérieure à celle des globulines (8,3 p. 100). FEILLET (1965) trouve des teneurs plus faibles (20 échantillons ; moyenne : 15,2 p. 100 ; maximum : 20 p. 100 ; minimum : 10,1 p. 100). BUSHUK et WRIGLEY (1974) évaluent à 11,1 p. 100 et à 3,4 p. 100 respectivement la teneur en albumines et en globulines d'une farine de blé de printemps canadien.

Exprimée en p. 100 des protéines totales, la teneur en protéines solubles est d'autant plus faible qu'il y a plus d'azote dans le grain (FEILLET et BOURDET, 1967 ; PEREIRA, 1971) ; elle serait

légèrement plus élevée chez les blés tendres que chez les blés durs (AUTRAN *et al.*, 1974 ; WALSH, 1970). Ramenée à 100 g de farine, la quantité de protéines solubles reste sensiblement constante pour une même variété ; suivant ce dernier mode d'expression, on observe par contre des différences importantes entre variétés : respectivement 1,51 g, 1,62 g et 2,45 g pour *Cappelle*, *Heurtebise* et *Progress* (FEILLET et BOURDET, 1967).

La composition n'est pas constante à l'intérieur du grain, les enveloppes étant plus riches en protéines solubles que l'albumen. BOURDET (1956) estime à 15 p. 100 les protéines solubles de la farine, à 20 p. 100 celles du blé entier et à 30 p. 100 celle des enveloppes ; de ce fait, les farines basses — qui proviennent principalement des parties périphériques du grain — sont les plus riches en albumines et globulines (FEILLET, 1965).

Les protéines adhérentes de HESS (1954) seraient plus riches en protéines solubles que les protéines interstitielles (ELTON et EWART, 1964). On explique de ce fait que les fractions fines isolées par turboséparation soient appauvries en protéines solubles (p. 100 des protéines totales) (WRIGLEY, 1963 ; BAUDET *et al.*, 1966). BARLOW *et al.* (1973) ont montré par ailleurs que la majorité des protéines associées aux grains d'amidon est de type albumines-globulines ; celles-ci pourraient être des enzymes dénaturées qui auraient participé à la synthèse de l'amidon pendant la maturation du grain.

III. — FRACTIONNEMENT ET PURIFICATION

Les protéines solubles du blé, dont l'hétérogénéité a été mise en évidence par électrophorèse sur papier (PENCE *et al.*, 1953), en gel d'amidon en milieu acide (KAMINSKI, 1962) ou basique (FEILLET et BOURDET, 1964) et en gel de polyacrylamide (NIMMO *et al.*, 1963), ont été purifiées à l'aide des techniques habituelles : relargage au sulfate d'ammonium, filtration sur gel de dextrane, chromatographie par échange d'ions, électrophorèse préparative. Les travaux les plus significatifs sont résumés tableau 1.

Suite aux fractionnements préliminaires de COATES et SIMMONDS (1961) et de NIMMO *et al.* (1963) sur DEAE-cellulose, il semble que KELLEY (1964) soit le premier à avoir isolé une albumine en combinant le relargage (tampon phosphate) et la chromatographie sur DEAE-cellulose ; la pureté de la fraction isolée est estimée à 96 p. 100 par électrophorèse en veine liquide.

L'albumine ALB 13, isolée par FEILLET et BOURDET (1968) par électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide et chromatographie sur DEAE-cellulose, se révèle hétérogène ; les deux fractions constitutives, de mobilités électrophorétiques similaires en milieu acide ou basique, sont fractionnées en ALB 13 A et 13 B par filtration sur gel de Séphadex G-50 (FEILLET et NIMMO, 1970). Simultanément, FISH et ABBOTT (1969) et EWART (1969, 1972) isolent chacun des albumines qui se révèlent respectivement identiques à ALB 13 A et 13 B.

Associant l'électrophorèse préparative au relargage au sulfate d'ammonium et à la chromatographie sur DEAE-cellulose, puis à la filtration sur gel de Séphadex G-100, SODINI *et al.* (1970), CANTAGALLI *et al.* (1971) et SILANO *et al.* (1973) isolent 6 albumines identifiées par leur mobilité électrophorétique : Mb 0,19 qui serait identique à ALB 13 A ; Mb 0,28 qui serait identique à ALB 13 B ; Mb 0,32, 0,35, 0,39 et 0,48.

Par combinaison du relargage au sulfate d'ammonium et de la chromatographie sur DEAE, cellulose (pH = 7,0) et CM-cellulose (pH = 4,8), SHAINKIN et BIRK (1973) isolent 2 albumines AmI_1 et AmI_2.

La purothionine est fractionnée en 2 composants par FISHER *et al.* (1968) et par REDMAN et FISHER (1968) par simple chromatographie sur CM-cellulose. Dans les mêmes conditions, REDMAN et FISHER isolent trois protéines CM_1, CM_2 et CM_3 préalablement extraites de la farine par le chloroforme-méthanol (2 : 1, V/V) (GARCIA-OLMEDO et CARBONERO, 1970).

Notons enfin la purification par chromatographie sur CM-cellulose (MATSUO et IRVINE, 1967) ou DEAE-cellulose (WALSH, 1970) d'une albumine basique très riche en cuivre.

TABLEAU I

Méthodes de purification des albumines du blé (1)

Références	Techniques de purification					Nomenclature
	Relargage	Chromatographie			Électrophorèse	
		Séphadex	DEAE	CMC		
KELLEY (1964)	Phosphate		9,1 (2)			
FEILLET et BOURDET (1968)			7,8 et 10,4		Polyacrylamide	ALB 13
FEILLET et NIMMO (1970)		G-50	10,4		Veine liquide	ALB 13 A et 13 B
FISH et ABBOTT (1969)		G-75		4,6 (2)		
EWART (1969, 1972)				5,2		
SODINI *et al.* (1970)	$SO_4(NH_4)_2$		7,8		Polyacrylamide	Mb 0,19
CANTAGALLI *et al.* (1971)		G-100			Polyacrylamide	Mb 0,28, 0,34 et 0,39
SILANO *et al.* (1973)		G-100			Polyacrylamide	Mb 0,28, 0,32, 0,35, 0,39 et 0,48
SHAINKIN et BIRK (1970)	$SO_4(NH_4)_2$		7,0	4,8		AmI_1 et AmI_2 (α-amylase inhibiteurs)
FISHER *et al.* (1968)	Extraction par l'éther de pétrole	G-75				Purothionine B et C
REDMAN et FISHER (1968)				5,2 et 3,5		α et β Purothionine
REDMAN et EWART (1973)				5,2 et 3,5		CM_1, CM_2 et CM_3

(1) Les purifications d'enzymes ne sont pas mentionnées.
(2) pH auquel est effectué le fractionnement.

IV. — PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

Caractéristiques générales

Les propriétés physico-chimiques des protéines solubles du blé sont encore mal connues. En raison de l'hétérogénéité du matériel protéique extrait par l'eau et les solutions salines, le nombre de protéines purifiées est relativement limité. En conséquence, les données actuellement disponibles rendent compte le plus souvent d'une composition moyenne des protéines constitutives des deux groupes protéiques, albumines et globulines.

Les préparations protéiques brutes isolées suivant le schéma d'Osborne sont contaminées par de nombreux composants non protéiques ; les teneurs en protéines (N × 5,7 p. 100 MS) des albumines et des globulines sont respectivement 9,1 et 14,0 ; celles en phosphore (γ p. 100 mg MS) sont 50 et 892 (Feillet et Bourdet, 1968). Des purifications plus poussées permettent d'isoler des préparations contenant 95 p. 100 de protéines environ (Pence et Elder, 1953). La teneur en phosphore des albumines est alors pratiquement nulle ; celle des globulines atteint 1,4 p. 100 ; le phosphore associé aux globulines est de type nucléique (Feillet, 1965 ; Feillet et Bourdet, 1968).

Il ressort du tableau 2 que, comparativement aux protéines du gluten, les protéines solubles sont pauvres en acide glutamique et en proline mais plus riches en acides aminés basiques. Sur la base des différences de teneur en azote amidé et en tryptophane des albumines, des globulines et des gliadines, Pence *et al.* (1954 *a*) proposent une méthode de détermination du pourcentage de ces trois groupes protéiques dans un extrait salin de farine.

Les données expérimentales sur les poids moléculaires des protéines solubles sont très fragmentaires et parfois contradictoires. Ceux des albumines seraient compris entre 12 000 et 60 000 (Minetti *et al.*, 1975), valeur moyenne : 28 000 (Pence et Elder, 1953) ; ceux des globulines pourraient atteindre 210 000 (Danielson, 1949).

Par électrophorèse en gel d'amidon, il est possible de déceler un minimum de 21 albumines (Feillet et Bourdet, 1968). Le nombre de fractions est sans nul doute bien plus élevé, la majorité des enzymes du grain étant du type « protéines solubles » ; au cours des opérations de fractionnement et de purification des albumines, il est habituel de déceler de nouveaux constituants non visibles dans les extraits bruts en raison de leur très faible concentration. Le nombre de fractions de type « globuline » atteindrait la quinzaine (Silano *et al.*, 1969) ; il semble que l'on puisse distinguer les globulines « rapides » et les globulines « lentes » sur la base de leur mobilité électrophorétique (Gehrke *et al.*, 1964 ; Feillet et Bourdet, 1968). L'hétérogénéité des protéines solubles a été confirmée par immunoélectrophorèse (Grabar *et al.*, 1965 ; Nimmo et Sullivan, 1967).

La composition des protéines solubles des blés tendres diffère de celle des blés durs (Pence *et al.*, 1954 ; Feillet, 1965 ; Silano *et al.*, 1969) ; sur la base de cette observation, des méthodes électrophorétiques (Resmini, 1968 ; Silano *et al.*, 1968 ; Feillet et Kobrehel, 1972 ; Minetti *et al.*, 1973 *b*) et immunoélectrophorétiques (Piazzi et Cantagalli, 1969) de dosage des produits de blé tendre dans les pâtes alimentaires ont été mis au point.

Après électrophorèse en gel de polyacrylamide et coloration des protéines par l'aniline blue-black, les albumines et les globulines se colorent respectivement en bleu-noir et en bleu-vert alors que les gliadines se colorent en brun rougeâtre (Silano et Pocchiari, 1971). Les différences observées entre les albumines et les globulines seraient essentiellement dues à des phénomènes métachromatiques induits dans l'aniline blue-black par les globulines (Minetti *et al.*, 1973) ; elles permettent d'identifier les composants de type « albumine » ou « globuline » présents dans un extrait de blé.

TABLEAU 2

Composition en acides aminés des protéines solubles
(g acides aminés pour 16 g N ou 100 g protéines)

	Groupes protéiques d'Osborne				Purothionine		Protéine	Alb.	Alb.	ALB	
	Albumine (1)	Globuline (1)	Gliadine (1)	Gluténine (1)	α (2)	β (2)	Kelley (3)	Fish (4)	Ewart (5)	13 A (6)	13 B (6)
Glycocolle	4,3	5,1	2,2	4,6	5,8	4,8	4,5	4,6	5,1	4,3	4,3
Alanine	5,2	5,9	2,1	3,7	3,1	4,4	3,5	8,7	5,5	8,9	5,4
Valine	5,9	5,6	3,9	4,8	2,1	2,0	5,4	6,9	10,3	7,1	10,0
Isoleucine	3,7	3,8	4,0	3,8	0,9	0,7	3,5	2,6	1,8	2,6	1,8
Leucine	7,3	7,7	6,8	7,2	10,6	10,8	8,9	8,3	7,9	8,4	7,7
Phénylalanine	3,8	3,8	5,7	4,6	2,9	3,1	2,9	2,2	0,2	2,3	traces
Proline	7,2	4,3	13,9	8,9	4,1	4,2	10,4	6,7	6,7	6,7	8,5
Sérine	4,7	4,9	4,5	5,3	9,1	8,1	4,9	4,9	5,1	4,9	5,7
Thréonine	3,8	4,2	2,2	3,3	5,8	4,8	5,1	2,5	2,2	2,5	2,4
Tyrosine	4,0	3,6	3,2	4,0	2,9	3,0	5,6	5,9	5,0	5,9	4,7
Cystéine	—	—	—	—	15,6	16,0	4,2	6,5	7,7	6,8	5,5
Méthionine	2,1	2,0	1,4	1,6	traces	traces	2,7	3,0	3,2	2,7	2,2
Lysine	4,2	7,5	0,9	3,1	13,1	15,0	2,5	3,3	5,9	3,0	6,1
Arginine	6,0	7,8	2,8	4,1	15,5	13,2	8,4	8,6	8,1	8,7	8,2
Histidine	2,5	2,2	2,2	2,0	traces	0,3	2,0	1,7	traces	1,9	0,1
Ac. aspartique	7,0	8,7	2,5	4,7	2,8	3,3	7,1	6,3	8,0	1,9	8,0
Ac. glutamique	19,1	11,6	43,4	29,3	5,8	4,8	13,9	13,0	12,7	13,7	12,3
Tryptophane	—	—	—	—	—	—	—	3,6	5,2	2,9	6,5

(1) Feillet, 1965 ; (2) Nimmo *et al.*, 1974 ; (3) Kelley, 1964 ; (4) Fisher et Abbott, 1969 ; (5) Ewart, 1969 ; (6) Feillet et Nimmo, 1970.

TABLEAU 2 (*suite*)

Composition en acides aminés des protéines solubles
(g acides aminés pour 16 g N ou 100 g protéines)

	Mb						Am		CM		
	0,19 (1)	0,28 (1)	0,32 (1)	0,35 (1)	0,39 (1)	0,48 (1)	I_1 (2)	I_2 (2)	1 (3)	2 (3)	3 (3)
Glycocolle	8,8	4,9	4,7	4,7	5,4	4,6	4,3	4,3	5,2	5,7	3,8
Alanine	14,1	5,7	6,1	4,9	5,7	5,9	5,4	8,6	3,8	2,8	4,1
Valine	7,9	9,3	8,1	8,9	9,4	8,0	10,1	5,2	5,7	6,8	6,6
Isoleucine	2,6	1,7	1,9	1,8	1,7	2,3	2,1	2,4	4,1	2,8	3,6
Leucine	8,8	7,5	7,4	7,3	7,8	7,7	7,7	8,5	6,8	7,0	10,4
Phénylalanine	1,7	traces	traces	traces	traces	traces	0,0	2,5	2,1	2,3	3,9
Proline	7,7	6,7	6,0	6,2	6,8	6,1	7,3	7,3	8,3	9,3	9,2
Sérine	6,7	5,0	3,6	4,9	5,1	4,4	5,4	4,2	6,1	4,7	5,7
Thréonine	3,0	2,3	1,9	2,5	2,3	2,7	1,6	2,5	4,9	5,9	4,1
Tyrosine	3,5	3,7	3,2	4,0	3,9	3,7	4,9	6,2	6,2	6,4	5,7
Cystéine	6,4	5,3	5,4	4,0	5,4	5,0	4,9	6,5	8,2	8,3	6,8
Méthionine	2,1	—	—	—	—	—	3,0	2,7	2,1	2,2	1,8
Lysine	2,8	6,0	4,7	5,1	5,8	4,6	5,7	2,9	3,2	3,0	2,7
Arginine	6,0	8,2	7,6	8,0	7,4	7,7	8,6	9,3	9,4	8,7	7,8
Histidine	1,7	traces	traces	traces	traces	traces	0,0	1,8	3,2	2,9	1,8
Ac. aspartique	6,2	7,9	6,8	7,0	7,7	7,1	7,4	6,4	10,2	9,5	6,1
Ac. glutamique	13,5	12,1	11,9	13,9	13,1	12,5	9,1	12,5	10,4	11,4	14,0
Tryptophane	—	—	—	—	—	—	3,8	2,4	0,0	0,0	1,5

(1) SILANO *et al.*, 1973. (2) SHAINKIN et BIRK, 1970. (3) REDMAN et EWART, 1973.

Protéines purifiées

Les principales propriétés des albumines purifiées sont rassemblées tableau 2 (composition en acides aminés) et 3 (propriétés physico-chimiques) ; elles concernent les albumines de KELLEY (1964), de FISH et ABBOT (1969), d'EWART (1969, 1972) ; ALB 13 A et 13 B (FEILLET et NIMMO, 1970) ; Mb 0,19, 0,28, 0,32, 0,35, 0,39 et 0,48 (SODINI *et al.*, 1970 ; SILANO *et al.*, 1973) ; AmI_1 et AmI_2 (SHAINKIN et BIRK, 1973) ; CM_1, CM_2 et CM_3 (REDMAN et EWART, 1973).

TABLEAU 3

Propriétés physico-chimiques des protéines solubles

	Poids moléculaire			Mobilité électrophorétique		pHi	Absorption spécifique	
	Ultra-filtration	Filtration sur gel	Acides aminés	μ	pH		$E^{1\%}_{cm}$	λ nm
Protéine KELLEY (1) ..	76 500			— 4,7	8,6			
Alb. FISH (2)	16 000	19 300	16 300				13,1	278
Alb. EWART (3)	30 200	18 000	26 200				19,0	280
ALB 13 A (4)	24 800	19 800	20 100	— 2,5	8,6		13,3	278
ALB 13 B (4)	13 950	11 200	12 900	— 2,5	8,6		20,5	279
Mb 0,19 (5)	23 800		20 200				12,6	278
Mb 0,28 (6)	13 300						17,6	278
Mb 0,32 (6)	14 600						14,7	278
Mb 0,35 (6)	14 100						14,7	278
Mb 0,39 (6)	13 000						17,1	278
Mb 0,48 (6)	13 400						11,4	278
AmI_1 (7)	18 215		13 500 (a)			9,0		
AmI_2 (7)	26 200					9,4		
CM_1 (8)			13 200					
CM_2 (8)			12 700					
CM_3 (8)			14 800					
α-Purothionine (9)	5 100	7 500		7,2	8,6			
β-Purothionine (9)	5 300			11,0	3,1			

(a) Calculé d'après les données de l'auteur.
(1) KELLEY, 1964 ;
(2) FISH et ABBOTT, 1969 ;
(3) EWART, 1969 et 1972 ;
(4) FEILLET et NIMMO, 1970 ;
(5) SODINI *et al.*, 1970 ;
(6) SILANO *et al.*, 1973 ;
(7) SHAINKIN et BIRK, 1973 ;
(8) REDMAN et EWART, 1973 ;
(9) NIMMO *et al.*, 1974.

La similitude de certaines des fractions isolées par différents auteurs — ALB 13 A, Mb 0,19, AmI_2 et Albumine de FISH d'une part, ALB 13 B, Mb 0,28, AmI_1 et Albumine d'EWART d'autre part — ressort clairement de l'examen de ces tableaux.

Par comparaison simultanée de certaines de ces protéines, SILANO *et al.* (1973) ont montré que ALB 13 A et Mb 0,19 étaient identiques ; de même ALB 13 B, Albumine d'EWART et Mb 0,28. Les albumines de la famille ALB 13 A sont caractérisées par une teneur élevée en alanine et un coefficient d'extinction faible ($E^{1\%}_{278\,nm} \sim 13$) ; celles de la famille ALB 13 B sont dépourvues de phénylalanine et d'histidine ; $E^{1\%}_{278\,nm}$ est élevé (~ 19). Les différences plus importantes

observées dans les valeurs du poids moléculaire peuvent provenir de l'association ou la dissociation des chaînes polypeptiques, variables suivant les conditions expérimentales utilisées. Il semble que le poids moléculaire des deux albumines soient respectivement ~ 26 000 (ALB 13 A) et ~ 13 500 (ALB 13 B) ; d'après SILANO *et al.* (1973), ALB 13 A serait constitué de deux sous-unités (PM : 13 000 et 14 500) dont l'une pourrait être ALB 13 B.

On notera enfin que la famille ALB 13 A inhibe les α-amylases de la salive humaine, du pancréas de poulet et de la larve de *Tenebrio molitor* ; la famille ALB 13 B inhibe seulement les α-amylases de la larve de *T. molitor*. Compte tenu de l'importance pondérale des ALB 13 A et 13 B, une proportion importante des albumines du blé possède donc un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de l'α-amylase (SILANO *et al.*, 1973).

Les propriétés spectrales (fluorescence, dichroïsme circulaire) de ces protéines ont été déterminées (FEILLET et NIMMO, 1970 ; SILANO *et al.*, 1973).

Les ALB 13 A et 13 B semblent absentes des blés durs (FEILLET et NIMMO, 1970). Une protéine cuivrique dont l'existence n'a pas été confirmée chez les blés tendres a par contre été isolée de *T. durum* (MATSUO et IRVINE, 1967) ; c'est une protéine basique dont la teneur en cuivre atteint 0,4 mg/g protéine.

Purothionine

La purothionine a été isolée la première fois par BALLS *et al.* (1942) à partir d'un extrait de farine par l'éther de pétrole ; par dissolution et précipitation successive par l'éthanol 70 p. 100 et 90 p. 100, ces auteurs obtiennent un produit cristallisé appelé « purothionine » en raison de sa richesse en soufre. Cette protéine devait faire l'objet d'études physico-chimiques très poussées près de trente ans plus tard (FISHER *et al.*, 1968 ; NIMMO *et al.*, 1968 ; NIMMO *et al.*, 1974 ; REDMAN et FISHER, 1968 ; REDMAN et EWART, 1969 ; REDMAN et EWART, 1973).

La purothionine est constituée de deux fractions α et β qu'il est possible de séparer par chromatographie sur CM-cellulose et de différencier par électrophorèse en gel d'acrylamide à pH = 3,1 (par définition, la fraction la plus mobile est α) ; leur mobilité est identique à celle du « doublet » globuline (ELTON et EWART, 1972). Les α et β-purothionines, de composition en acides aminés très voisine, sont particulièrement riches en lysine, arginine et cystéine, mais dépourvues de tryptophane (tabl. 2) ; cette composition est semblable à celle du « doublet ». Leur poids moléculaire serait d'environ 5 200 (déterminé par ultracentrifugation) bien que des valeurs plus élevées soient obtenues par filtration sur gel (7 500) ou mesure de pression osmotique (6 100). Les spectres de dichroïsme circulaire et la viscosité intrinsèque permettent de supposer que la purothionine est une protéine de type globulaire dont 40 p. 100 est sous forme α-hélice (NIMMO *et al.*, 1974).

La fonction de la purothionine est mal connue. Des propriétés bactéricides et bactériostatiques lui ont été attribuées (STUART et HARRIS, 1942) ; on a montré plus récemment qu'il y avait des différences de spécificité antimicrobienne entre les formes α et β (FERNANDEZ DE CALEYA *et al.*, 1972).

Glycoprotéines et nucléoprotéines

L'existence de glycoprotéines dans les albumines a été supposée par de nombreux auteurs en raison de la pauvreté en azote de certaines protéines purifiées. Selon LUNDIG et NEUKOM (1963), la principale fraction glycoprotéique du blé contient du galactose et de l'arabinose, mais pas de xylose ; les acides N-terminaux seraient la tyrosine et le tryptophane ; la glycoprotéine-2 est responsable de la gélification d'extrait aqueux de farine en présence d'oxydants ; cette gélification réclame la présence de traces d'ions ferriques ou calcium (PAINTER et NEUKOM, 1968). Les liaisons glycopeptidiques sont instables en milieu acide (ROHRLICH *et al.*, 1963).

Les globulines contiendraient une fraction importante de nucléoprotéines (FEILLET, 1965 ; BOURDET et FEILLET, 1967). Elles rassembleraient la majeure partie des histones présentes dans l'albumen du grain, dont les albumines sont totalement dépourvues (AUTRAN, 1973).

V. — IMPORTANCE TECHNOLOGIQUE

L'influence des protéines solubles des farines sur la qualité du pain est mal connue. La majorité des études a en effet porté sur l'ensemble des constituants hydrosolubles ou salinosolubles sans faire de distinction entre les albumines et globulines d'une part, et les composants non protéiques (pentosanes notamment) d'autre part ; la présence de gliadine dans les extraits aqueux complique également l'interprétation des résultats. Enfin, la question de savoir si les protéines solubles jouent un rôle autre que celui de porter des activités enzymatiques (amylases, protéases, oxydases) n'est pas clairement résolue (FEILLET, 1967).

Rôle des protéines solubles

Selon FINNEY (1943), l'élimination des fractions solubles des farines provoque chez certaines variétés une diminution de près de 30 p. 100 du volume du pain ; l'effet est nul dans d'autres cas. MAES (1966) signale que la qualité boulangère est négativement corrélée à la teneur en protéines hydrosolubles des farines, conclusion confirmée par les travaux de POLANOWSKI et SUBDA (1969), suivant lesquels la qualité boulangère est d'autant meilleure que la teneur en albumines des farines est faible.D'après HOSENEY et FINNEY (1971), les constituants de la farine solubles dans l'eau ne seraient cependant pas responsables des différences de qualité observées entre les variétés, mais leur présence serait nécessaire au développement du pain. SHUEY et GILLES (1973) observent que l'élimination des protéines solubles modifie assez sensiblement les farinogrammes et que l'importance des effets observés dépend des conditions d'extraction des protéines (rapport farine/eau) et de la teneur en protéines des farines. CUBADDA *et al.* (1968), enfin, observent que la vitesse de solubilisation dans l'eau des protéines de la farine permet de différencier des variétés de bonne ou mauvaise qualité boulangère.

En plus de leurs effets sur la qualité boulangère des farines, deux autres fonctions ont été attribuées aux protéines solubles :

— Selon SIMMONDS *et al.* (1973), la vitrosité des grains est corrélée à la quantité de produit, y compris les protéines solubles, extractible des grains d'amidon par le pyrophosphate de sodium.

— Une albumine, riche en cuivre et fortement colorée, serait responsable de la coloration brune des pâtes alimentaires fabriquées à partir de certains blés durs (MATSUO et IRVINE, 1967 ; WALSH, 1970).

Mécanisme d'action des protéines solubles

Analysant les mécanismes selon lesquels les protéines solubles pourraient intervenir, MECHAM (1963) envisage trois possibilités :

— Réaction avec les oxydants : l'addition de bromate de potassium à un extrait aqueux de farine provoque la formation d'un gel qui modifierait les caractéristiques rhéologiques des pâtes.

— Modification des liaisons disulfures existantes entre les protéines du gluten par formation d'équilibres nouveaux suivant la réaction proposée par SULLIVAN *et al.* (1963) :

$$Pr_1\ SH + Pr_2\ S - S\ Pr_2 \leftrightharpoons Pr_2\ SH + Pr_1\ S - S\ Pr_2$$

Pr_1 = Protéines solubles
Pr_2 = Protéines du gluten

et transfert des liaisons —S—S— à l'intérieur des protéines du gluten, transfert auquel BLOKSMA (1958) attribue une grande importance :

— Activités enzymatiques spécifiques.

Cherchant à faire la part des fractions solubles protéiques et non protéiques, Pence *et al.* (1950, 1951 et 1954 *b*) aboutissent aux conclusions suivantes :

— L'adjonction des pentosanes à une farine dont les fractions solubles dans l'eau ont été éliminées entraîne un accroissement de volume du pain inférieur à celui obtenu par apport de la fraction hydrosoluble totale.

— L'adjonction des seules albumines a un effet comparable à celui de la fraction hydrosoluble totale.

— La qualité des protéines (définie par la valeur du coefficient de régression entre le volume des pains et la teneur en protéines des farines) est corrélée au rapport teneur en albumines/teneur en globulines.

Au contraire, Hoseney et Finney (1971) indiquent que les constituants actifs seraient d'une part les fractions dialysables qui contribueraient à la formation de CO_2, et d'autre part les pentosanes solubles et les glycoprotéines qui faciliteraient la rétention des gaz et participeraient à l'extensibilité du gluten ; les albumines et les globulines n'auraient pas d'effet sur la qualité boulangère des farines.

Selon Mattern et Sandstedt (1957), la solubilisation des gliadines avec les albumines permettrait d'expliquer l'augmentation du temps de formation de la pâte observée après élimination des protéines solubles dans l'eau. Farley *et al.* (1963) suggèrent que les différences de qualité entre les blés seraient partiellement reliées à la composition en acides aminés des albumines et des globulines.

Conclusion

S'il est indéniable que les constituants de la farine solubles dans l'eau sont nécessaires au maintien d'une bonne qualité boulangère, les résultats expérimentaux sont trop contradictoires pour conclure au rôle actif des albumines et des globulines. Une étude rigoureuse, basée sur une meilleure définition et caractérisation des protéines solubles, serait donc indispensable pour préciser les propriétés fonctionnelles — autres qu'enzymatiques — des albumines et des globulines.

Reçu pour publication en février 1976.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Autran J.-C., 1973. *Les désoxyribonucléoprotéines et les histones du grain de blé. Aspects physicochimique et physiologique.* Thèse, Université de Paris VI.

Autran J.-C., Fleury B., Joudrier P., Bourdet A., 1974. Blés hexaploides, blés tétraploïdes et espèces sauvages. Étude comparée de leur composition protéique et de l'hétérogénéité de certaines fractions. *Symposium franco-soviétique sur l'amélioration génétique de la qualité des blés durs*, 18-21 juin, Montpellier, France.

Balls A. K., Hale W. S., Harris T. H., 1942. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem.*, **29**, 279-288.

Barlow K. K., Buttrose M. S., Simmonds D. H., 1973. The nature of the starch-protein interface in wheat endosperm. *Cereal Chem.*, **50**, 443-454.

Barre R., 1951. Préparation et purification des protéines des amandes. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **33**, 1473-1482.

Baudet J., Bourdet A., Charbonnier L., Feillet P., Godon B., Mosse J., Petit C., 1966. Caractérisation des fractions protéiques des produits turboséparés. *Ind. agric. alim.*, **83**, 537-551.

Baudet J., Mosse J., 1962. Étude de l'extraction des protéines des graines. I. Extraction par l'eau des protéines de la farine de blé. *Ann. Physiol. vég.*, **4**, 315-331.

Baudet J., Mosse J., Moureaux T., 1965. Sur les causes du fractionnement des protéines de la farine de blé solubles dans l'eau lors de leur extraction : interaction avec les composés phosphorés. *C. R. Acad. Sci.*, **260**, 1007-1009.

Blocksma A. H., 1958. Die Bedeutung von Thiol und Disulfidgruppen im Kleber für die Backfähigkeit. *Getreide Mehl*, **8**, 66-69.

BODO G., 1961. Über die Veranderungen der Weizenkornprotein durch stickstoff Düngung. *Getreide Mehl*, **11**, 75-80.

BOURDET A., 1956. Les protides des céréales. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 181-318.

BOURDET A., FEILLET P., 1967. Distribution of phosphorus compounds in the protein fractions of various types of wheat flours. *Cereal Chem.*, **44**, 457-482.

BUSHUK W., WRIGLEY C. W., 1974. *Proteins: composition, structure and function.* In : *Wheat: production and utilization*, ed. by INGLETT G. E., Avi Pub. Co., Westport, U.S.A., 119-145.

CANTAGALLI P., DI GIORGIO G., MORISI G., POCCHIARI F., SILANO V., 1971. Purification and properties of three albumins from *Triticum aestivum* seeds. *J. Sci. Food Agric.*, **22**, 256-259.

CHAPON L., CHOLLOT B., URION E., 1961. Étude physico-chimique des associations entre protéines végétales et substances polyphénoliques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **43**, 429-442.

COATES H. J., SIMMOND D. H., 1961. Proteins of wheat and flour. Extraction, fractionation and chromatography of the buffer soluble proteins of flour. *Cereal Chem.*, **38**, 256-272.

CUBADDA R., LINTAS C., QUATTRUCCI E., 1968. Relazioni tra comportamento delle proteine idrosolubili e caratteristiche technologiche di alcune varieta italiane di frumento tenero. *Quad. della Nutrizione*, **28**, 47-62.

DANIELSON C. E., 1949. Seed globulins of the graminae and leguminosae. *Biochem. J.*, **44**, 387-400.

ELTON G. A. H , EWART J. A. D., 1962. Starch gel electrophoresis of cereal proteins. *J. Sci. Food Agr.*, **13**, 62-72.

ELTON G. A. H., EWART J. A. D., 1964. Electrophoretic comparison of cereal proteins. *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 62-72.

EWART J. A. D., 1969. Isolation and characterisation of a wheat albumin. *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 729-733.

EWART J. A. D., 1972. Isolation of an albumin from *Cappelle, Desprez* and *Manitou* wheats. *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 701-705.

FARLEY M. A., BANASIK O. J., GILLES K. A., 1963. The aminoacid distribution in albumin and globulin proteins as related to flour quality. *Cereal Sci. Today*, **8**, 124.

FEILLET P., 1965. Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques. *Ann. Technol. agric.*, **14** (H.S.), 1-94.

FEILLET P., 1967. Les protéines solubles de la farine de blé ont-elles une importance technologique? *Techn. Meunière*, (111), 8-11.

FEILLET P., 1967. Les protéines solubles des céréales. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 135-182.

FEILLET P., BOURDET A., 1964. Sur le comportement en gel d'amidon des protéines de blé solubles en milieu salin neutre. *C. R. Acad. Sci.*, **258**, 2939-2932.

FEILLET P., BOURDET A., 1967. Composition protéique et caractéristiques génétiques des blés. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **49**, 1273-1283.

FEILLET P., BOURDET A., 1968. Les protéines solubles du blé. I. Isolement et caractérisation des albumines et des globulines. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 217-225.

FEILLET P., BOURDET A., 1968. Les protéines solubles du blé. II. Fractionnement des albumines par chromatographie sur DEAE-cellulose et par électrophorèse préparative. Isolement d'une protéine électrophorétiquement homogène. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 267-276.

FEILLET P., NIMMO C. C., 1970. Soluble proteins of wheat. III. Isolation and characterisation of two albumins, ALB 13 A and ALB 13 B, from flour. *Cereal Chem.*, **47**, 448-464.

FEILLET P., KOBREHEL K., 1972. Recherche et dosage des produits de blé tendre dans les pâtes alimentaires par électrophorèse des protéines solubles. *Ann. Technol. agric.*, **21**, 17-24.

FERNANDEZ DE CALEYA R., GONZALEZ-PASCUAL B., GARCIA-OLMEDO F., CARBONERO P., 1972. *Appl. Microbiol.*, **23**, 998.

FINNEY K. F., 1943. Fractionating and reconstituing techniques as tools in wheat flour research. *Cereal Chem.*, **20**, 381-396.

FISH W. W., ABBOTT D. C., 1969. Isolation and characterisation of a water-soluble wheat-flour protein. *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 723-729.

FISHER N., REDMAN D. G., ELTON G. A. H., 1968. Fractionation and characterisation of purothionin. *Cereal Chem.*, **45**, 48-57.

GARCIA-OLMEDO F., CARBONERO P., 1970. *Phytochemistry*, **9**, 1945.

GRABAR P., ESCRIBANO M. J., BENHAMOU N., DAUSSANT J., 1965. Immunochemical study of wheat, barley and malt proteins. *J. Agr. Food Chem.*, **13**, 392-398.

HESS K., 1954. Protein, kleber und lipoids in weizenkorn und mehl. *Kolloid Z.*, **136**, 84-89.

HOSENEY R. C., FINNEY K. F., 1971. Functional (breadmaking) and biochemical properties of wheat flour components. XI. A review. *Baker's digest*, **45**, 30-36, 39-40, 64, 67.

KAMINSKI E., 1962. Study of wheat proteins soluble in water, salt-solution, 70 p. 100 ethanol and dilute acetic acid by starch-gel electrophoresis. *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 603-607.

KASARDA D. D., NIMMO C. C., KOHLER G. O., 1971. Proteins and the aminoacid composition of wheat fractions. In : *Wheat chemistry and technology*, Ed. by Y. POMERANZ, A.A.C.C., Saint-Paul, Minnesota, 227-299.

KELLEY J. J., 1964. Purification and properties of a salt-soluble protein from wheat flour. *Arch. Biochem. Biophys.*, **106**, 167-172.

KELLEY J. J., KOENIG V. L., 1962. Electrophoretic analysis of flour proteins. I. « Salt soluble » proteins. *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 644-650.

KUNDIG W., NEUKOM N., 1963. Untersuchungen über Getreideschleimostoffe. VI. Abban eine glycoproteines mit proteolytischen Enzymen. *Helv. Chim. Acta*, **46**, 1423-1426.

MAES E., 1962. Progressive extraction of proteins. *Nature*, (193), 880.

MAES E. E., 1966. Protein solubility and baking quality. *Cereal Sci. Today*, **11**, 200l

MATSUO R. R., IRVINE G. N , 1967. Macaroni brownness. *Cereal Chem.*, **44**, 78-85.

MATTERN P. J., SANDSTEDT R. M., 1957. The influence of the water soluble constituents of wheat flour on its mixing and baking characteristics. *Cereal Chem.*, **34**, 252-267.

MECHAM D. K., 1963. Soluble proteins in flour important to baking properties. *Nat. Conf. Wheat Utilization Res.*, **2**, 201-208.

MINETTI M., PETRUCCI T., CATTANEO S., POCCHIARI F., SILANO V., 1973 *a*. Studies of the differential staining of wheat albumin, globulin and gliadin in polyacrylamide gel by aniline blue-back. *Cereal Chem.*, **50**, 198-209.

MINETTI M., RAB A. V., SILANO V., POCCHIARI F., 1973 *b*. Specific basic protein from bread wheat. *J. Sci. Food Agric.*, **24**, 1397-1406.

MINETTI M., MORISI G., SILANO V., ACCARDI N., 1975. Albumin pools with different extraction behavior in wheat seed. *Cereal Chem.*, **52**, 298-305.

MOSSE J., BAUDET J., GUYON P., 1964. Mise au point d'un procédé d'extraction continu des protéines d'une farine de graine. Application à la farine de blé. *C. R. Acad. Sci.*, **258**, 368-371.

NIMMO C. C., O'SULLIVAN M. T., 1967. Immunochemical comparisons of antigenic proteins of *durum* and *hard red spring* wheats. *Cereal Chem.*, **44**, 584-591.

NIMMO C. C., O'SULLIVAN M. T., BERNARDIN J. E., 1968. The relation of a « globulin » of wheat flour to purothionin. *Cereal Chem.*, **45**, 28-36.

NIMMO C. C., O'SULLIVAN M. T., MOHAMMAD A., PENCE J. W., 1963. Fractionation and zone electrophoresis of proteins of water soluble materials of flour. *Cereal Chem.*, **40**, 390-398.

NIMMO C. C., KASARDA D. D., LEW E. J. L., 1974. Physical characterisation of the wheat protein purothionin. *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 607-617.

OLSON G. A., 1914. The quantitative estimation of the salt-soluble proteins in wheat flour. *Ind. Engl. Chem.*, **6**, 211-214.

OSBORNE T. B., 1907. The proteins of the wheat kernel. *Carnegie Institution of Washington*, Pub. nº 84.

PAINTER T. J., NEUKOM H., 1968. The mechanism of oxidative gelation of a glycoprotein from wheat flour. Evidence from a model system based on caffeic acid. *Biochem. Biophys. Acta*, **158**, 363.

PENCE J. W., ELDER A. H., 1953. The albumins and globulins proteins of wheat. *Cereal Chem.*, **30**, 275-287.

PENCE J. W., ELDER A. H , MECHAM D. K., 1950. Preparation of wheat flour pentosans for use in reconstituted doughs. *Cereal Chem.*, **28**, 60-66.

PENCE J. W., ELDER A. H., MECHAM D. K., 1951. Some effects of soluble flour components on baking behavior. *Cereal Chem.*, **28**, 94-104.

PENCE J. W., WEINSTEIN N. E., MECHAM D. K., 1954 *a*. A method for the quantitative determination of albumins and globulins in wheat flour. *Cereal Chem.*, **31**, 29-37.

PENCE J. W., WEINSTEIN N. E., MECHAM D. K., 1954 *b*. The albumin and globulin contents of wheat flour and their relationship to protein quality. *Cereal Chem.*, **31**, 303-311.

PEREIRA A., 1971. Proteinas do trigo. III. Variacao da gliadina, da glutenina e da albumina e globulina com a proteina total do grao. *Agro. Lusit.*, **33**, 87-100.

PIAZZI S. E., CANTAGALLI F., 1969. Immunochemical analysis on soluble proteins of wheat. *Cereal Chem.*, **46**, 642-646.

POLANOWSKI A., SUBDA H., 1969. Trypsin inhibitor and baking quality of wheat flour. *Hodowla Rosl. Aklim. Nasiennictwo*, **13**, 141-147.

REDMAN D. G., ELDON G. A., 1969. Reduction and re-oxydation of the purothionins. *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 546.

REDMAN D. G., EWART J. A. D., 1973. Characterization of three wheat proteins found in chloroform-methanol extracts of flours. *J. Sci. Food Agric.*, **24**, 629-636.

REDMAN D. G., FISHER N., 1968. Fractionation and comparison of purothionin and globulin component of wheat. *J. Sci. Food Agric.*, **19**, 651.

RESMINI P., 1968. Un nuovo metodo per identificare e dosare gli sfarinati di grano tenero presenti in quelli di grano duro e nelle pasta alimentari. *Tec. Molitoria*, **19**, 145-168.

ROHRLICH M., ESSNER W., LICHTENTELS J., 1963. Versuche zur chemischen Differenzierun der Eiwesstoffe des Weizens und Roggens. *Z. Lebensmittel. Unters. u. Forsch.*, **119**, 118-123.

SHAINKIN R., BIRK Y., 1970. α-amylase inhibitors from wheat, isolation and characterisation. *Biochim. Biophys. Acta*, **221**, 502-513.

SHUEY W. C., GILLES K. A., 1973. A note on the effect of water-flour ratio on flour protein extracted by employing a paint shaker. *Cereal Chem.*, **50**, 161-168.

SILANO V., DE CILLIS U., POCCHIARI F., 1969. Varietal differences in albumin and globulin in fractions of *Triticum aestivum* and of *Triticum durum*. *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 260-261.

SILANO V., POCCHIARI F., 1971. A specific color reaction of albumin, globulin, and gliadin preparation from wheat. *Cereal Chem.*, **48**, 445-447.

SILANO V., POCCHIARI F., KASARDA D. D., 1973. Physical characterization of α-amylase inhibitors from wheat. *Biochim. Biophys. Acta*, **317**, 139-148.

SIMMONDS D. H., BARLOW K. K., WRIGLEY C. W., 1973. The biochemical basis of grain hardness in wheat. *Cereal Chem.*, **50**, 553-562.

SODINI G., SILANO V., DE AGAZIO M., POCCHIARI F., TENTORI L., VIVALDI G., 1970. Purification and properties of a *Triticum aestivum* specific albumin. *Phytochemistry*, **9**, 1167-1172.

STUART L. S., HARRIS T. H., 1942. Bactericidal and fungicidal properties of a crystalline proteins isolated from unbleached wheat flour. *Cereal Chem.*, **19**, 288-300.

SULLIVAN B., DAHLE D. K., SCHIPKE J. H., 1963. The oxidation of wheat flour. IV. Labile and non labile sulfhydryl groups. *Cereal Chem.*, **40**, 515-531.

WALSH D. E., 1970. *The proteins of durum wheat; their influence on spaghetti quality.* Thesis, St. Univ., Fargo, North Dakota, U.S.A.

WRIGLEY C. W., 1963. The protein composition of air classified flour proteins. *J. Sci. Food Agric.*, **14**, 120-124.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (2), 217-218.

CHRONIQUE DES LIVRES

CHEFTEL J.-C., CHEFTEL H., BESANÇON P. — INTRODUCTION A LA BIOCHIMIE ET A LA TECHNOLOGIE DES ALIMENTS. — Paris, Lavoisier, 2 vol., 400 et 432 p.

L'enseignement de la Technologie alimentaire est apparu comme une nécessité pour la formation des Ingénieurs et Techniciens supérieurs destinés à cette industrie. Beaucoup d'Universités et d'Écoles d'Ingénieurs donnent déjà un tel enseignement.

Il manquait un livre en langue française auquel les professeurs et les élèves puissent se référer. Deux enseignants de l'Université de Montpellier viennent de l'écrire.

Ils ont associé à leur travail Henri CHEFTEL qui possède une grande expérience acquise dans l'industrie alimentaire.

La biochimie sert de base à cet ouvrage et en constitue le fil conducteur. Les données de Génie industriel interviennent là où elles sont nécessaires, sans que les procédés soient étudiés comme une suite d'opérations unitaires.

La nombreuse bibliographie surtout anglo-saxonne permet de retrouver les travaux originaux les plus marquants, ou les livres et mises au point spécialisés qui permettront d'en savoir davantage.

Les divers aspects de la technologie alimentaire et de ses rapports avec la nutrition sont abordés dans les 10 chapitres de l'ouvrage.

1 : L'eau.
2 : Lait, viande, graines, fruits et légumes, graisses.
3 : Agents et mécanismes de détérioration des aliments
4 : Caractères organoleptiques.
5 : Qualité nutritionnelle des aliments.
6 : Toxicologie alimentaire.
7 : Traitement de préservation.
8 : Emballage.
9 : Hygiène.
10 : Législation.

Ce livre vient combler une lacune. Par sa bibliographie raisonnée, il constitue un ouvrage de référence utile au professeur, au chercheur et à l'étudiant. Il permettra aussi, à tous ceux, qui à un moment donné, ont besoin d'un renseignement sur l'industrie alimentaire de le trouver facilement grâce à un Index très complet.

P. DUPUY.

RIBEREAU-GAYON J., PEYNAUD E., RIBEREAU-GAYON P., SUDRAUD P. — TRAITÉ D'ŒNOLOGIE. SCIENCES ET TECHNIQUES DU VIN. — Tome 3, VINIFICATIONS. TRANSFORMATIONS DU VIN. — Paris, Dunod, 1976, 719 p.

Ce troisième volume du *Traité d'Œnologie* est consacré aux opérations œnologiques qui commencent à l'amélioration de la vendange et se terminent avec le vieillissement du vin. Les opérations techniques de sulfitage, levurage et traitements du raisin sont étudiées dans leur principe et dans leur réalisation pratique. On aborde ensuite les différentes techniques traditionnelles de vinification :

la vinification en rouge et la macération ;
la vinification en blanc ;

la vinification en rosé ;
les vinifications spéciales (mousseux, vin doux, sous voile).
Cent pages sont consacrées aux techniques plus récentes :
vinification continue ;
vinification avec macération carbonique ;
vinification avec chauffage de la vendange.

Les deux cents dernières pages concernent les transformations physico-chimiques qui se produisent dans le vin fait : nature et stabilité des colloïdes protéiques et glucidiques, précipitations métalliques et tartriques, modifications induites par l'oxygène et étude du vieillissement dans ses aspects théoriques et pratiques.

En résumé, il s'agit ici des techniques qui permettent de faire passer dans le vin toutes les potentialités présentes dans le raisin, c'est donc le cœur de l'ouvrage. Si on ne devait acheter qu'un tome, c'est celui-là qu'il faudrait choisir.

Ceux qui ont, pendant de nombreuses années, consulté le *Traité d'Œnologie* de J. Ribereau-Gayon et E. Peynaud, sont heureux de retrouver reprises dans ce nouvel ouvrage, les observations et expériences de base qui depuis Ulysse Gayon ont été accumulées par les œnologues bordelais. Les données les plus récentes n'en sont pas pour autant négligées et sont parfaitement intégrées dans cet ensemble.

Ce livre montre que les transformations œnologiques, malgré leurs subtilités, peuvent être étudiées avec des méthodes scientifiques. En particulier, l'action des paramètres, sur lesquels l'homme peut intervenir, est décrite avec beaucoup de rigueur. Cependant, tout n'est pas encore clair en œnologie et il faut savoir gré aux auteurs de nous signaler les points sur lesquels les opinions peuvent diverger.

L'étudiant trouvera dans ce livre des schémas clairs et des faits bien classés qui faciliteront l'assimilation de cette partie subtile et parfois empirique de l'œnologie.

Le chercheur sera plus intéressé par une bibliographie raisonnée très complète.

Le praticien découvrira, grâce à de nombreux exemples, le bien-fondé de telle ou telle pratique et pourra décider lui-même de l'application qu'il doit en faire.

Nous attendons maintenant, avec impatience, le tome 4 qui traitera de l'œnologie curative et du matériel œnologique.

P. Dupuy.

annales de technologie agricole

Trimestriel

1976

Vol. 25 N° 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (3), 219-230.

ACTIVITÉ LIPOLYTIQUE DU LAIT DE CHÈVRE

I. — MISE EN ÉVIDENCE D'UNE ACTIVITÉ LIPOPROTÉINE-LIPASIQUE

Y. CHILLIARD et P. M. FEHR

avec la collaboration technique de Jeanine LAFOND et Michelle DORLÉANS

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Zootechnie, I. N. R. A.,
Institut national agronomique Paris-Grignon
16, rue Claude-Bernard
75231 Paris Cedex 05

RÉSUMÉ

Le lait et le colostrum de chèvre présentent une activité lipolytique hydrolysant les triglycérides de l'*Intralipide* lorsqu'ils sont activés par du sérum sanguin.

Les caractéristiques d'inhibition par le chlorure de sodium et le sulfate de protamine, le pH optimum et un Km apparent très proche de celui observé avec la lipoprotéine-lipase du tissu adipeux de chèvre, permettent de penser que cette activité lipolytique est essentiellement due à l'enzyme lipoprotéine-lipase.

Le coefficient de variation de la mesure de l'activité lipoprotéine-lipasique est d'environ 10 %.

INTRODUCTION

Des activités lipolytiques ont été mises en évidence dans le lait de nombreuses espèces, et en particulier des activités de type lipoprotéine-lipasique (LPL) (1) dans le lait de vache (KORN, 1962), de cobaye (Mc BRIDE et KORN, 1963), de ratte (HAMOSH et SCOW, 1971) et de femme (HERNELL et OLIVECRONA, 1974).

Des travaux récents suggèrent que l'activité lipolytique du lait de vache est due en majeure partie à une seule enzyme (HOYNES et DOWNEY, 1973; CASTBERG *et al.*, 1975) ayant de nombreuses caractéristiques communes avec les LPL tissulaires définies par KORN (OLIVECRONA *et al.*, 1975). L'objectif de cette étude est de

(1) Les abréviations utilisées sont les suivantes : LPL (lipoprotéine-lipase); AGNE (acides gras non estérifiés).

mettre en évidence la présence éventuelle d'une activité de type LPL dans le lait de chèvre, en raison de l'importance que peut avoir cette activité en technologie laitière et en physiologie animale.

MATÉRIEL

Les principaux produits utilisés sont les suivants :

— Albumine bovine (Cohn, fraction V, Powder), Sigma Chemical Company (Saint-Louis, U.S.A.);

— Héparinate de sodium (158 UI/mg), Roussel Uclaf (Paris, France);

— *Intralipide* (10 %), Vitrum (Vitry-sur-Seine, France). Composition : huile de soja purifiée (10 %), lécithine d'œuf purifiée (1,2 %), glycérol dilué (2,5 %), eau distillée;

— Protamine sulfate (from salmon, Grade II), Sigma Chemical Company (Saint-Louis, U.S.A.).

Les solutions sont préparées comme suit :

— solution d'albumine bovine à 18 % (p/v) dans du chlorure sodium (0,154 M), ajustée à pH 8,3 (à 20°C) avec une solution normale d'ammoniaque;

— solution de Tris (1,6 M) tamponnée à pH 8,3 avec de l'acide chlorhydrique concentré.

MÉTHODES

Les chèvres reçoivent du foin de luzerne à volonté et un mélange d'aliments concentrés orge, avoine, tourteau de soja, minéraux, vitamines (600 g/j + 300 g par kg de lait au-dessus d'une production de 2 kg). La traite est effectuée manuellement et le lait est aussitôt filtré et, soit congelé puis stocké à — 25°C, soit conservé à 0 — 4°C pendant 2 à 3 heures, jusqu'à l'essai enzymatique. Il a été vérifié que la congélation n'entraîne pas de baisse d'activité lipolytique décelable, pendant 3 mois au moins. Lorsque l'activité lipolytique du colostrum est étudiée, celui-ci est prélevé à la deuxième traite, moins de 24 h après la mise-bas.

La méthode de mesure de l'activité LPL est une modification de celle d'Egelrud et Olivecrona (1972).

Le substrat est obtenu en « activant » une émulsion lipidique commerciale (*Intralipide* à 10 %) au cours d'une incubation (45 mn à 35°C, sous agitation) en présence de sérum sanguin ou de plasma sanguin de chèvre, prélevé sur oxalate de Na (8 ml de sérum pour 1 ml d'*Intralipide*). Les caractéristiques de l'activité LPL sur ce substrat sont très voisines de celles observées sur des chylomicrons (Boberg et Carlson, 1964; Biale et Shafrir, 1969; Riley et Robinson, 1974) ou sur des lipoprotéines de très basse densité (Fielding, 1972; De Pury et Collins, 1972).

L'incubation enzymatique de 30 à 60 mn à 35°C sous agitation, débute à l'instant où 0,5 ml de lait dilué au 1/10 dans une solution de NaCl (0,154 M) à 0-4°C, est ajouté à 2,0 ml du mélange suivant : 1 vol. de tampon Tris-HCl, 1,6 M, à pH 8,3; 2 vol. d'une solution d'héparinate de sodium à 12,8 UI/ml; 3 vol. d'une solution à 18 % (p/v) d'albumine bovine dans NaCl 0,154 M, à pH 8,3; 4 vol. d'*Intralipide* activé.

Chaque échantillon de lait dilué est généralement incubé en double, et les concentrations en acides gras non estérifiés (AGNE) sont mesurées, aux temps zéro et 30 ou 60 minutes, par la méthode semi-automatique d'Antonis (1965). Les lipides sont extraits par l'éther di-iso-propylique en présence d'acide silicique, qui adsorbe les phospholipides, puis sont repris par le chloroforme après évaporation de l'éther. Les extraits chloroformiques sont passés en double à l'autoanalyseur (*Technicon*, A II) et les AGNE sont dosés sous forme de savons cuivriques formant un complexe coloré avec le diéthyldithiocarbamate de sodium. La reproductibilité du passage à l'autoanalyseur est de 3 % et celle du dosage des AGNE d'environ 3 à 4 % (Chilliard *et al.*, 1977).

Il est vérifié qu'il n'y a pas de libération d'AGNE dans le milieu incubé sans enzyme, en remplaçant le lait par du lait chauffé à 55°C ou par du NaCl 0,154 M.

L'activité LPL est exprimée en µEq d'acides gras libérés par heure et par ml de lait entier (µEq AG/h/ml).

RÉSULTATS

1. — *Reproductibilité du dosage*

La fiabilité du dosage est estimée de 3 façons :

— la répétition de la mesure sur un même lait, qui donne lieu à des coefficients de variation de 5 à 10 % (4 à 6 répétitions par lait, sur 4 laits ayant une activité lipolytique de 47 à 68 μEq AG/h/ml) ;

— la droite de régression obtenue pour 60 doubles d'incubation est $y = 0{,}99\,x + 0{,}29$ ($r = 0{,}99$). La répétabilité est estimée par l'écart-type résiduel de 1,53 μEq AG/h/ml et le coefficient de variation résiduelle de 12 %.

— la mesure de l'activité LPL d'un lait de chèvre a été effectuée simultanément par nous-mêmes et par R. LUZEAU (Unité d'Hépatologie Infantile de l'I.N.S.E.R.M., C.H.U. du Kremlin-Bicêtre) qui utilise la méthode colorimétrique de Novak (1965), basée sur l'extraction des lipides selon DOLE (1956), pour le dosage des AGNE. Les résultats obtenus par les deux laboratoires sont respectivement de 47 et 52 μEq AG/h/ml.

2. — *Linéarité de l'activité lipolytique*

Les libérations d'AGNE sont proportionnelles à la quantité de lait ajouté (fig. 1) et au temps d'incubation (fig. 2). Les activités lipolytiques sont donc mesurées, dans les conditions standard, en période de vitesse initiale.

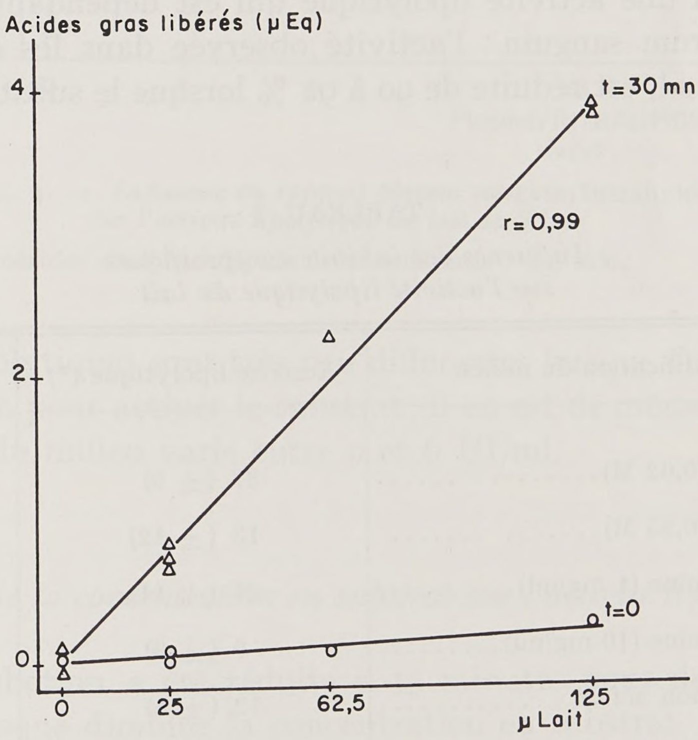


FIG. 1. — *Influence de la quantité de lait sur la libération d'acides gras*

L'incubation est effectuée dans les conditions décrites dans le paragraphe « méthodes », en utilisant les quantités de lait indiquées sur la figure.

3. — *Influence des conditions de milieu qui inhibent spécifiquement la LPL*

L'activité lipolytique est peu inhibée par le fluorure de sodium (0,02 M), mais fortement inhibée par le chlorure de sodium (0,85 M) et le sulfate de protamine

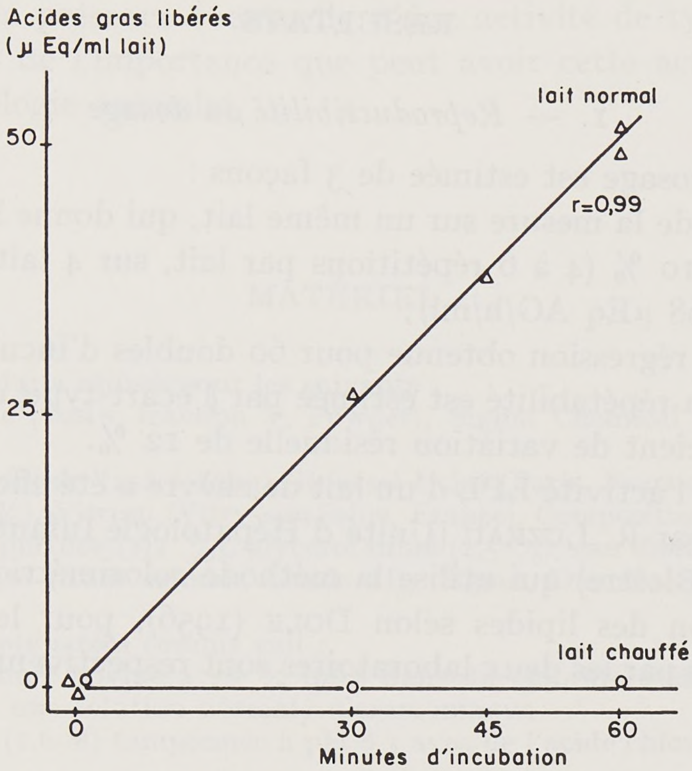


FIG. 2. — *Influence de la durée d'incubation sur la libération d'acides gras*
L'incubation est effectuée dans les conditions standard (Δ) ou avec du lait chauffé au préalable (o).

(1 à 10 mg/ml). En outre, elle n'hydrolyse pas les triglycérides de l'*Intralipide* non activé par du plasma sanguin (tabl. 1).

Le colostrum a une activité lipolytique qui est dépendante de l'activation du substrat par du sérum sanguin : l'activité observée dans les conditions standard, de 3 à 7 μEq AG/h/ml, est réduite de 90 à 92 % lorsque le substrat n'est pas activé.

TABLEAU I

Influence des inhibiteurs spécifiques sur l'activité lipolytique du lait

Modification du milieu	Activité lipolytique (*)	*n* (**)
+ NaF (0,02 M)................	92 (± 9)	3
+ NaCl (0,85 M)................	13 (± 12)	4
+ Protamine (1 mg/ml)..........	21 (± 11)	6
+ Protamine (10 mg/ml).........	0 (± 0)	2
Substrat non activé.............	12 (± 8)	3

Les activités lipolytiques sont exprimées en % des activités observées dans les conditions standard (45 à 60 μEq AG/h/ml). Les concentrations en additifs sont les concentrations finales dans le milieu. Une solution de NaCl 0,154 M remplace le plasma sanguin de chèvre dans le substrat non activé.

(*) Moyennes (± écart-type).

(**) *n* : nombre de déterminations.

4. — *Conditions optimales de milieu pour l'activité lipolytique*

Le pH optimum est compris entre 8,3 et 9,0.

Lorsque le rapport plasma sanguin/*Intralipide* varie, l'activité lipolytique passe par un maximum pour un rapport très voisin de celui employé dans les conditions standard (fig. 3).

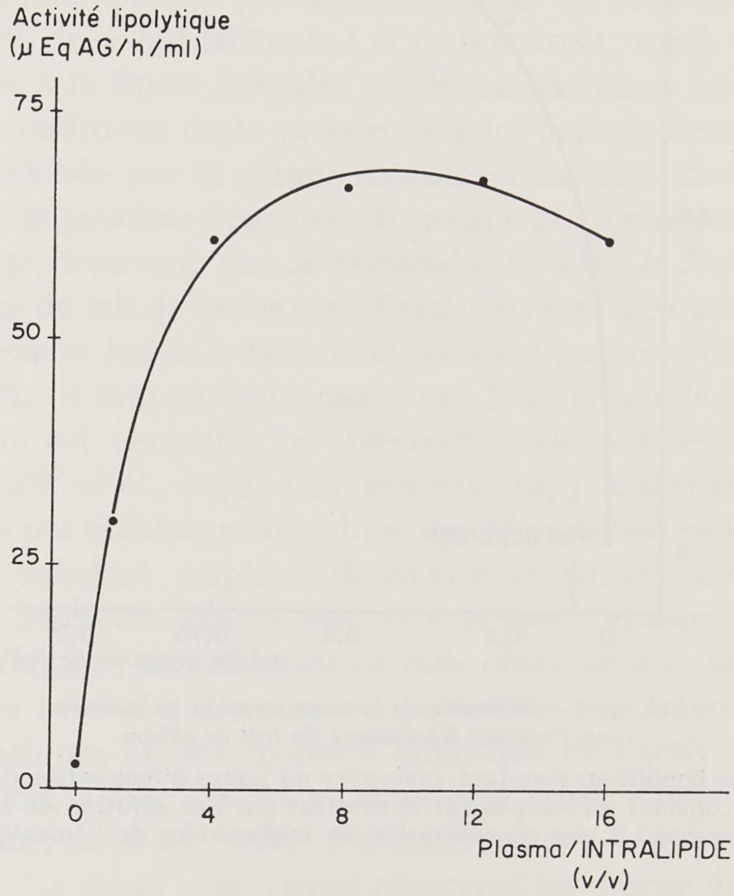


FIG. 3. — *Influence du rapport plasma sanguin/*Intralipide *sur l'activité lipolytique du lait de chèvre*

La concentration en triglycérides de l'*Intralipide* reste constante : 3,6 mM.

Les activités lipolytiques sont très peu différentes lorsque l'on emploie du sérum ou du plasma sanguin pour activer le substrat ; il en est de même lorsque la concentration en héparine du milieu varie entre 0 et 6 UI/ml.

5. — *Influence de la concentration en substrat sur l'activité lipolytique* (fig. 4)

La durée d'incubation a été réduite à 15 minutes pour demeurer en période de vitesse initiale lorsque diminue la concentration en substrat. Les concentrations en AGNE au temps zéro varient avec la concentration en substrat, parce que celui-ci contient des AGNE, présents dans le plasma sanguin et l'*Intralipide*. Les activités lipolytiques ont donc été calculées en utilisant la droite de régression des concentrations en AGNE au temps zéro ($r = 0{,}98$, $n = 5$). Les données de la figure 4 permettent de calculer un Km apparent d'environ 0,25 mM de triglycérides de l'*Intralipide* activés, et une vitesse initiale maximum apparente de 52,8 µEq AG/h/ml, par la méthode de EISENTHAL et CORNISH-BOWDEN (1974).

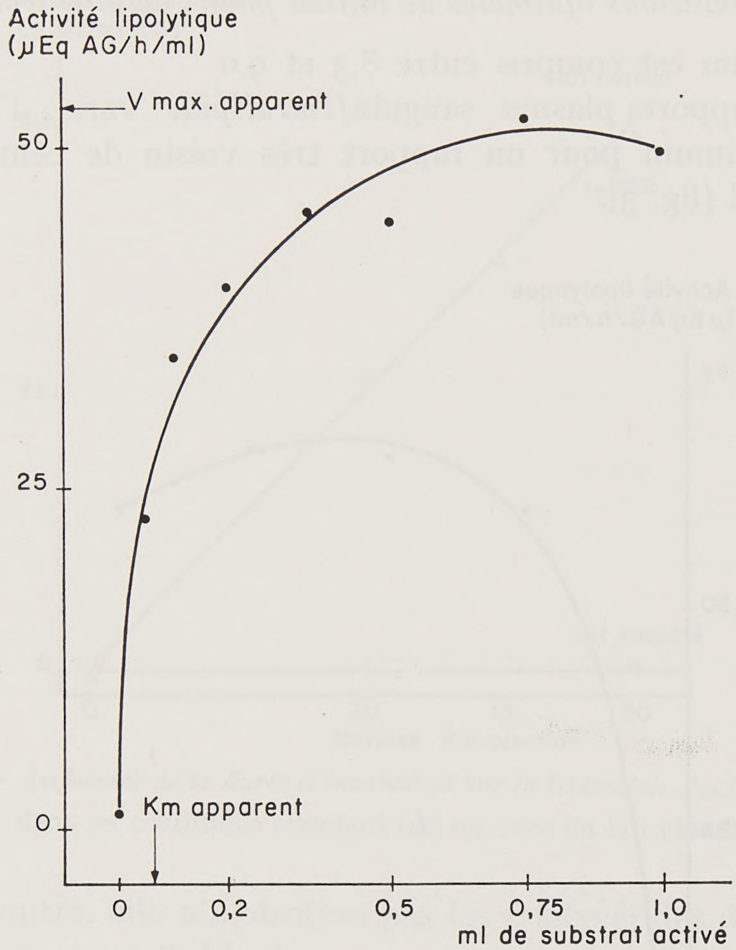


FIG. 4. — *Influence de la concentration en substrat sur l'activité lipolytique du lait de chèvre*

L'essai est réalisé dans les conditions standard, mais avec un temps d'incubation de 15 minutes. Le volume final est maintenu constant en remplaçant le substrat par une solution de NaCl 0,154 M. Un ml de substrat activé correspond à une concentration en triglycérides de l'*Intralipide* de 3,8 mM.

DISCUSSION

La constatation d'une activité lipolytique dans le lait entier ne permet pas de préjuger de sa nature. Il est fréquent d'utiliser des variations dans les conditions de milieu et des inhibiteurs spécifiques pour caractériser les activités enzymatiques. La validité de certains de ces critères pour la LPL, en particulier l'inhibition par le chlorure de sodium, ayant été remise en cause récemment (DOWNEY, 1975), il a été jugé utile de discuter en détail les résultats de cette étude à la lumière des faits rapportés dans la bibliographie.

— L'activité lipolytique observée dans le lait de chèvre est peu inhibée par le fluorure de sodium, en accord avec ce qui a été observé avec l'activité LPL du lait de femme (LUZEAU *et al.*, 1975). Le fluorure de sodium n'inhibe pas l'activité LPL du tissu adipeux (CHERKES et GORDON, 1959), alors qu'il inhibe les activités d'autres lipases de ce tissu (RIZACK, 1961; BJORNTORP et FURMAN, 1962; GORIN et SHAFRIR, 1964; STRAND *et al.*, 1964).

— L'inhibition de l'activité lipolytique par le chlorure de sodium (0,5 et 1 M), *ajouté directement dans le milieu d'incubation*, est considérée par la plupart des auteurs comme une caractéristique de la LPL. En effet, de nombreuses activités ipasiques ne sont pas inhibées par cette addition : triglycéride-lipases du tissu

adipeux (RIZACK, 1961; BJORNTORP et FURMAN, 1962; BOYER, 1967; HELLER et STEINBERG, 1972; PITTMAN *et al.*, 1972; KHOO et STEINBERG, 1974); monoglycéride-lipases et phospholipases du tissu adipeux, du foie, du cœur ou du plasma post-héparine (YAMAMOTO et DRUMMOND, 1967; BIALE et SHAFRIR, 1969; FIELDING, 1972; GRETEN *et al.*, 1969, 1972; ELKELES, 1974); triglycéride-lipases du foie (CARTER, 1967; FIELDING, 1972; LA ROSA *et al.*, 1972; GRETEN *et al.*, 1974). Toutefois, la lipase du lait de femme stimulée par les sels biliaires est sensible à l'inhibition par le NaCl, comme la LPL de ce lait (HERNELL et OLIVECRONA, 1974). L'interférence d'une enzyme comparable à la lipase stimulée par les sels biliaires est cependant très peu probable dans les conditions de la présente étude, puisque cette lipase est inactive sur l'*Intralipide*, inhibée par le sérum sanguin et inactive dans les milieux où est mesurée l'activité lipoprotéine-lipasique (HERNELL et OLIVECRONA, 1974).

DOWNEY (1975), trouvant que *la préincubation dans le NaCl* 1 M n'inhibe pas l'activité lipolytique du lait de vache sur l'*Ediol* activé, pense que l'inhibition observée en ajoutant directement le NaCl dans le milieu n'est pas un critère valable de caractérisation de la LPL. Il faut toutefois noter que l'inhibition de l'activité LPL par le chlorure de sodium est réversible ou irréversible, suivant les conditions de manipulation (BENSADOUN *et al.*, 1974; OLIVECRONA, 1975; CASTBERG *et al.*, 1975). Par ailleurs, l'inhibition par le chlorure de sodium ajouté au milieu est largement influencée par la nature du substrat employé (EGELRUD et OLIVECRONA, 1973; RILEY et ROBINSON, 1974). Plusieurs études ont montré que l'attaque par les lipases des substrats du type *Ediol* ([1]) est différente de celle observée avec des chylomicrons, des lipoprotéines ou de l'*Intralipide*, avec en particulier une interférence des activités monoglycéride-lipasiques et une moindre inhibition de l'activité LPL par le NaCl (BOBERG et CARLSON, 1964; DATTA et WIGGINS, 1964; KUPIECKI, 1966; BIALE et SHAFRIR, 1969; GRETEN *et al.*, 1969; FIELDING, 1972; ELKELES, 1974; PYKALISTO *et al.*, 1974). Enfin, LA ROSA *et al.* (1972) observent les mêmes différences de réponse au NaCl des activités triglycéride-lipasiques du foie et du tissu adipeux lorsqu'ils emploient soit la préincubation, soit l'addition directe de NaCl au milieu.

L'activité tributyrinasique du lait de vache observée par HOYNES et DOWNEY (1973) est inhibée par le NaCl ajouté au milieu d'incubation et ces auteurs estiment de ce fait que le NaCl n'est pas un inhibiteur spécifique de la LPL. Néanmoins, cette activité lipolytique diffère de celle de la lipase pancréatique qui n'est pas inhibée par le NaCl 0,5 à 1 M lorsqu'elle agit sur la tributyrine en absence de sels biliaires (BORGSTROM et ERLANSON, 1973). Par ailleurs, EGELRUD et OLIVECRONA (1973) ont montré que le NaCl (0,5 à 1 M) inactive la LPL purifiée du lait de vache agissant sur la tributyrine, au bout de 5 à 10 minutes d'incubation.

L'inhibition par le NaCl ajouté au milieu, bien que ne prouvant pas l'identité de l'activité lipolytique observée, contribue donc à la mise en évidence de la nature lipoprotéine-lipasique de cette activité.

— Les triglycérides en émulsion, non activés par du sérum, sont très peu hydrolysés par la LPL des tissus (KORN, 1955) et par la LPL purifiée du lait de vache (EGELRUD et OLIVECRONA, 1972) et de femme (HERNELL et OLIVECRONA, 1974).

(1) Ces substrats contiennent des glycérides partiels (FREDRICKSON *et al.*, 1963), des détergents (TWEEN 60) et des triglycérides à longueur de chaîne moyenne (huile de coprah).

Un rapport de 4 à 16 ml de plasma pour 100 mg de triglycérides de l'*Intralipide* permet d'obtenir une stimulation optimale de l'activité lipolytique du lait de chèvre (fig. 3), en accord avec ce que rapportent ROBINSON (1963 a) sur la LPL des tissus et HERNELL et OLIVECRONA (1974) sur la LPL du lait de femme. ASKEW *et al.* (1970) observent un rapport optimum pour l'activité lipolytique du lait de vache d'environ 1,4 ml de sérum pour 100 mg de triglycérides de l'*Ediol,* ainsi qu'une forte inhibition avec un rapport d'environ 2,2. Cette particularité pourrait être due à l'utilisation d'un substrat différent.

— Des co-facteurs sanguins sont nécessaires à l'activité lipolytique du colostrum de chèvre qui semble donc due à la LPL. Or, une activité LPL a déjà été observée dans le colostrum de femme (HERNELL et OLIVECRONA, 1974; ODIEVRE et LUZEAU, 1976) et de cobaye (McBRIDE et KORN, 1963). Par contre, dans le colostrum de vache, DRIESSEN et STADHOUDERS (1975) trouvent une activité lipolytique ayant des caractères distincts de celle du lait normal, et qui n'est pas détectable dans les conditions de mesure de l'activité LPL. L'activité lipolytique du colostrum de chèvre est faible par rapport à celle du lait prélevé ultérieurement (CHILLIARD et FEHR, 1976).

— La protamine ajoutée au milieu d'incubation inhibe les activités des LPL partiellement purifiées des laits de vache (OLIVECRONA *et al.*, 1971) et de femme (HERNELL et OLIVECRONA, 1974) mais aussi l'activité stimulée par les sels biliaires trouvée dans le lait humain. DOWNEY (1975) n'observe cependant pas d'inhibition de l'activité du lait de vache par le sulfate de protamine (1 mg/ml) ajouté au milieu d'incubation, en utilisant de l'*Ediol* activé comme substrat. DATTA et WIGGINS (1964) rapportent que la protamine et le NaCl n'inhibent pas l'activité lipolytique du plasma post-héparine sur un substrat très voisin de l'*Ediol* alors que le NaCl inhibe cette activité sur les chylomicrons et les lipoprotéines.

— Le pH optimum des activités LPL des laits de ratte et de cobaye (HAMOSH et SCOW, 1971) et de vache (ASKEW *et al.*, 1970; EGELRUD et OLIVECRONA, 1973; DOWNEY, 1975) est compris entre 8 et 9, comme celui observé ici sur le lait de chèvre.

— Dans les conditions de mesure utilisées ici, la présence d'héparine n'a pas d'influence sur l'activité lipolytique. IVERIUS *et al.*, (1972) font remarquer que l'héparine n'augmente l'activité LPL que lorsque les conditions de milieu ne sont pas optimales.

— La valeur absolue du Km apparent (0,25 mM) observée en utilisant du lait entier de chèvre comme source d'enzyme, doit être considérée avec prudence, d'autant plus que les valeurs rapportées par d'autres auteurs présentent de grandes variations selon la nature du substrat employé et que la concentration effective en substrat pour l'enzyme dépend de l'aire de l'interface de l'émulsion (BENZONANA et DESNUELLE, 1965), qui est inconnue dans cette étude. Cependant, nous avons observé avec le même substrat un Km apparent de 0,19 mM pour l'activité LPL du tissu adipeux de chèvre (CHILLIARD *et al.*, 1977). BRADY et HIGGINS (1967) ont aussi rapporté des Km très voisins pour les activités LPL de plusieurs tissus de rat.

CONCLUSION

L'activité lipolytique du lait de chèvre, dans les conditions de mesure employées dans cette étude, est peu inhibée par le fluorure de sodium, fortement inhibée par

le chlorure de sodium concentré et le sulfate de protamine. Elle présente un pH optimum alcalin et un Km apparent très voisin de celui observé dans les mêmes conditions pour la LPL du tissu adipeux de chèvre. Les activités lipolytiques du colostrum et du lait sont stimulées fortement par la présence de co-facteurs sanguins dans le substrat. L'ensemble de ces résultats permet de penser que ces activités sont essentiellement dues à l'enzyme lipoprotéine-lipase. Cette enzyme est d'ailleurs la lipase majeure présente dans le tissu mammaire de différentes espèces : cobaye (McBride et Korn, 1963; Robinson, 1963 b), ratte (Hamosh *et al.*, 1970), lapine (Falconer et Fiddler, 1970), vache (Askew *et al.*, 1970), chèvre (Chilliard, non publié).

Reçu pour publication en novembre 1976

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mme R. Luzeau; MM. J. Hervieu et D. Sauvant; MMmes F. Ternois et A. Rouzeau pour les conseils et l'assistance qu'ils nous ont fournis au cours de ce travail.

SUMMARY

GOAT MILK LIPOLYTIC ACTIVITY

I. — EVIDENCES FOR A LIPOPROTEIN LIPASE ACTIVITY

Goat milk and colostrum are found to contain a lipolytic activity. This activity against long chain tryglycerides *(Intralipid)* is enhanced severalfold when the triglycerides are activated by a preincubation with blood serum.

The incorporation of sodium chloride or protamine sulfate in the incubation mixture strongly reduces the activity. An alkaline pH optimum (8-9) is observed; and an apparent Km of 0,25 mM triglyceride is obtained, similar to that found for the lipoprotein lipase of goat adipose tissue.

The results allow to think that the lipolytic activity determined on goat milk is essentially due to the enzyme lipoprotein lipase.

The reproductibility of the measure of the lipoprotein lipase activity is estimated (the coefficient of variation is about 10 %).

RESUMEN

ACTIVIDAD LIPOLITICA DE LA LECHE DE CABRA

I. — PUESTA EN EVIDENCIA DE UNA ACTIVIDAD LIPOPROTEINA-LIPASICA

La leche y el calostro de cabra presentan una actividad lipolitica que hidroliza los triglicéridos del *Intralipido* cuando son activados mediante suero sanguineo.

Las caracteristicas de inhibicion mediante el cloruro de sodio y el sulfato de protamina, el pH optimo y un Km aparente muy cercano del que se observo con la lipoproteina-lipasa del tejido adiposo de la cabra, permiten pensar que esta actividad lipolitica se debe, sobre todo, a la enzima lipoproteina-lipasa.

El coeficiente de variacion de la medida de la actividad lipoproteina-lipasica es aproximadamente del 10 %.

RIASSUNTO

ATTIVITA' LIPOLITICA DEL LATTE DI CAPRA
I. — MESSA IN EVIDENZA DI UN'ATTIVITA LIPOPROTEINA-LIPASICA

Il latte e il colostro di capra presentano un'attività lipolitica che idrolizza i trigliceridi dell'*Intralipide* quando essi sono attivati da siero sanguigno.

Le caratteristiche d'inibizione mediante il cloruro di sodio e il solfato protamina, il pH ottimo e un Km apparente molto vicino a quello osservato con la lipoproteina-lipasi del tessuto adiposo della capra, permettendo di pensare che quest'attività lipolitica è dovuta essenzialmente all'enzima lipoproteina-lipasi.

Il coefficiente di variazione della misura dell'attività lipoproteina-lipasica è di circa 10 %.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Antonis A., 1965. Semiautomated method for the colorimetric determination of plasma free fatty acids. *J. Lipid. Res.*, **6**, 307-312.

Askew E. W., Emery R. S. et Thomas J. W., 1970. Lipoprotein lipase of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **53**, 1415-1423.

Bensadoun A., Ehnholm C., Steinberg D. et Brown W. V., 1974. Purification and characterization of lipoprotein lipase from pig adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, **249**, 2220-2227.

Benzonana G. et Desnuelle P., 1965. Étude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycérides en émulsion. Essai d'une enzymologie en milieu hétérogène. *Biochim. Biophys. Acta*, **105**, 121-136.

Biale Y. et Shafrir E., 1969. Lipolytic activity toward tri and monoglycerides in postheparin plasma. *Clin. Chim. Acta*, **23**, 413-419.

Bjorntorp P. et Furman R. H., 1962. Lipolytic activity in rat epididymal fat pads. *Am. J. Physiol.*, **203**, 316-322.

Boberg J. et Carlson L. A., 1964. Determination of heparin induced lipoprotein lipase activity in human plasma. *Clin. Chim. Acta.*, **10**, 420-427.

Borgstrom B. et Erlanson C., 1973. Pancreatic lipase and co-lipase. Interaction and effets of bile salts and other detergents. *Eur. J. Biochem.*, **37**, 60-68.

Boyer J., 1967. L'activité lipolytique du tissu adipeux. I. Mesures potentiométriques dans un extrait brut de tissu adipeux de rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **137**, 59-69.

Brady M. et Higgins J. A., 1967. The properties of the lipoprotein lipases of rat heart, lung and adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, **137**, 140-146.

Carter J. R., 1967. Hepatic lipase in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **137**, 147-156.

Casterg H. B., Egelrud T., Solberg P. et Olivecrona T., 1975. Lipases in bovine milk and the relationship between the lipoprotein lipase and tributyrate hydrolysing activities in cream and skim-milk. *J. Dairy Res.*, **42**, 255-266.

Cherkes A. et Gordon R. S., 1959. The liberation of lipoprotein lipase by heparin from adipose tissue incubated in vitro. *J. Lipid. Res.*, **1**, 97-101.

Chilliard Y., Dorleans M. et Fehr P. M., 1977. Mise en évidence d'une activité lipoprotéine-lipasique dans le tissu adipeux de chèvre : comparaison de trois méthodes d'extraction. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **17**, (1) (sous presse).

Chilliard Y. et Fehr P. M., 1976. Activité lipolytique du lait de chèvre. II. Quelques variations physiologiques de l'activité lipoprotéine-lipasique. *Ann. Technol. agric.* (sous presse).

Datta D. V. et Wiggins H. S., 1964. New effects of sodium chloride and protamine on human post-heparin plasma « lipoprotein » lipase activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **115**, 788-792.

De Pury G. G. et Collins F. D., 1972. Very low density lipoproteins and lipoprotein lipase in serum of rats deficient in essential fatty acids. *J. Lipid. Res.*, **13**, 268-275.

Dole V. P., 1956. A relation between non esterified fatty acids in plasma and metabolism of glucose. *J. Clin. Invest.*, **35**, 150-154.

Downey W. K., 1975. Identity of the major lipolytic enzymes activity of bovine milk in relation to spontaneous and induced lipolysis. In « Proceedings of the lipolysis symposium — Cork », *Fed. Int. Laiterie, Document* **86**, 80-89.

Driessen F. M. et Stadhouders J., 1975. The lipolytic enzymes and co-factors responsible for spontaneous rancidity in cow's milk. In « Proceedings of the lipolysis symposium — Cork ». *Fe .Int. Laiterie, Document* **86**, 73-79.

Egelrud T. et Olivecrona T., 1972. The purification of a lipoprotein lipase from bovine skim milk. *J. Biol. Chem.*, **247**, 6212-6217.

Egelrud T. et Olivecrona T., 1973. Purified bovine milk (lipoprotein) lipase : activity against lipid substrates in the absence of exogenous serum factors. *Biochim. Biophys. Acta*, **306**, 115-127.

Eisenthal R. et Cornish-Bowden A., 1974. The direct linear plot. A new graphical procedure for estimating enzyme kinetic parameters. *Biochem J.*, **139**, 715-720.

Elkeles R. S., 1974. Lipoprotein lipase in human adipose tissue. *Clin. Sci. Mol. Med.*, **46**, 753-762.

Falconer I. R. et Fiddler T. J., 1970. Effects of intraductal administration of prolactin, actinomycin D and cycloheximide on lipoprotein lipase activity in the mammary glands of pseudopregnant rabbits. *Biochim. Biophys. Acta*, **218**, 508-514.

Fielding C. J., 1972. Further characterisation of lipoprotein lipase and hepatic post-heparin lipase from rat plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, **280**, 569-578.

Fredrickson D. S., Ono K. et Davis L. L., 1963. Lipolytic activity of post-heparin plasma in hyperglyceridemia. *J. Lipid Res.*, **4**, 24-33.

Gorin et Shafrir E., 1964. Lipolytic activity in adipose tissue homogenate toward tri-, di-, and monoglyceride substrates. *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 24-34.

Greten H., Levy R. I. et Fredrickson D. S., 1969. Evidence for separate monoglyceride hydrolase and triglyceride lipase in post-heparin human plasma. *J. Lipid. Res.*, **10**, 326-330.

Greten H., 1972. Post-heparin plasma phospholipases in normal and patients with hyperlipoproteinemia. *Klin. Wschr.*, **50**, 39-41.

Greten H., Sniderman A. D., Chandler J. G., Steinberg D. et Brown W. V., 1974. Evidence for the hepatic origin of a canine post-heparin plasma triglyceride lipase. *FEBS Letters*, **42**, 157-160.

Hamosh M., Clary T. R., Chernick S. S. et Scow R. O., 1970. Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **210**, 473-482.

Hamosh M. et Scow R. O., 1971. Lipoprotein lipase activity in guinea pig and rat milk. *Biochim. Biophys. Acta*, **231**, 283-289.

Heller R. A. et Steinberg D., 1972. Partial glyceridase activity of a protein-kinase activatable triglyceride lipase from rat adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta*, **270**, 65-73.

Hernell O. et Olivecrona T., 1974. Human milk lipases. I. Serum-stimulated lipase. *J. Lipid. Res.*, **15**, 367-374.

Hoynes M. C. T. et Downey W. K., 1973. Relationship of the lipase and lipoprotein lipase activities of bovine milk. *Biochim. Soc. Transact.*, **1**, 256-259.

Iverius P. H., Lindahl U., Egelrud T. et Olivecrona T., 1972. Effects of heparin on lipoprotein lipase from bovine milk. *J. Biol. Chem.*, **247**, 6610-6616.

Khoo J. C. et Steinberg D., 1974. Reversible protein-kinase activation of hormone-sensitive lipase from chicken adipose tissue. *J. Lipid. Res.*, **15**, 602-610.

Korn E. D., 1955. Clearing factor lipase, a heparin-activated lipoprotein lipase. II. Substrate specificity and activation of coconut oil. *J. Biol. Chem.*, **215**, 15-26.

Korn E. D., 1962. The lipoprotein lipase of cow's milk. *J. Lipid. Res.*, **3**, 246-250.

Kupiecki F. P., 1966. Partial purification of monoglyceride lipase from adipose tissue. *J. Lipid. Res.*, **7**, 230-235.

La Rosa J. C., Levy R. I., Windmueller H. G. et Fredrickson D. S., 1972. Comparison of the triglyceride lipase of liver, adipose tissue and post-heparin plasma. *J. Lipid. Res.*, **13**, 356-363.

Luzeau R., Odievre M., Levillain P. et Lemonnier A., 1975. Activité de la lipoprotéine-lipase dans les laits de femme inhibiteurs in vitro de la conjugaison de la bilirubine. *Clin. Chim. Acta*, **59**, 133-138.

Mc Bride O. W. et Korn E. D., 1963. The lipoprotein lipase of mammary gland and the correlation of its activity to lactation. *J. Lipid. Res.*, **4**, 17-23.

Novak M., 1965. Colorimetric ultramicro method for the determination of free fatty acids. *J. Lipid. Res.*, **6**, 431-433.

Odievre M. et Luzeau R., 1976. Communication personnelle.

Olivecrona T., Egelrud T., Iverius P. M. et Lindahl U., 1971. Evidence for an ionic binding of lipoprotein lipase to heparin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **43**, 524-529.

Olivecrona T., 1975. Discussion in « Proceedings of the lipolysis symposium - Cork ». *Fed. Int. Laiterie, Document* **86**, 90.

Olivecrona T., Egelrud T., Hernell O., Castberg H. et Solberg P., 1975. Is there more than one lipase in bovine milk ? In « Proceedings of the lipolysis symposium - Cork ». *Fed. Int. Laiterie, Document* **86**, 61-72.

Pittman R. C., Golanty E. et Steinberg D., 1972. A second form of hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue homogenates. *Biochim. Biophys. Acta*, **270**, 81-85.

Pykalisto O. J., Vogel W. C. et Bierman E. L., 1974. The tissue distribution of triacylglycerol lipase, monoacyl-glycerol lipase and phospholipase A in fed and fasted rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **369**, 254-263.

RILEY S. E. et ROBINSON D. S., 1974. Studies on the assay of clearing factor lipase (lipoprotein lipase). *Biochim. Biophys. Acta*, **369**, 371-386.

RIZACK M. A., 1961. An epinephrine sensitive lipolytic activity in adipose tissue. *J. Biol. Chem.*, **236**, 657.

ROBINSON D. S., 1963 a. Clearing factor lipase and its action in the transport of fatty acids between the blood and the tissues. *Advanc. Lipid. Res.*, **1**, 133-181.

ROBINSON D. S., 1963 b. Changes in the lipolytic activity of the guinea pig mammary gland at parturition. *J. Lipid. Res.*, **4**, 21-23.

STRAND O., VAUGHAN M. et STEINBERG D., 1964. Rat adipose tissue lipases : hormone-sensitive lipase activity against triglycerides compared with activity against lower glycerides. *J. Lipid. Res.* **5**, 554-562.

YAMAMOTO M. et DRUMMOND G. I., 1967. Monoglyceride-hydrolysing activity of rat myocardium. *Am. J. Physiol.*, **213**, 1365-1370.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (3), 231-237

ACTIVITÉ LIPOLYTIQUE DU LAIT DE CHÈVRE

II. — QUELQUES VARIATIONS PHYSIOLOGIQUES DE L'ACTIVITÉ LIPOPROTÉINE-LIPASIQUE

Y. CHILLIARD et P. M. FEHR

avec la collaboration technique de Jeanine LAFOND et Michelle DORLÉANS

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Zootechnie, I. N. R. A.,
Institut national agronomique Paris-Grignon
16, rue Claude-Bernard
75231 Paris Cedex 05

RÉSUMÉ

L'activité lipoprotéine-lipasique du lait de chèvre augmente fortement jusqu'à la 25e semaine de lactation. Elle est différente d'un animal à l'autre au même stade de lactation et semble être réduite par la sous-alimentation ou le jeûne. Les valeurs de cette activité sont très voisines en début et en fin de traite et paraissent stables d'une lactation à l'autre.

Les implications pratiques que pourraient avoir ces résultats en technologie laitière et en physiologie animale sont discutées.

INTRODUCTION

Le colostrum et le lait de chèvre contiennent une activité lipoprotéine-lipasique (LPL) (CHILLIARD et FEHR, 1976). Chez les autres espèces, la plupart des auteurs rapportent d'importantes variations des activités lipasiques du lait, d'un animal à l'autre. Quelques études ont été consacrées aux variations physiologiques de ces activités dans les laits de cobaye (MCBRIDE et KORN, 1963), de femme (ODIEVRE et LUZEAU, 1976), de bufflesse (SAMMANWAR et GANGULI, 1974) et de vache (HEMINGWAY *et al.*, 1970; ANTILA et ALI-YRKKO, 1975; BORGES, 1975), alors que les variations physiologiques de la lipolyse spontanée dans le lait de vache ont été largement étudiées (JELLEMA et SCHIPPER, 1975).

L'objet de cette étude est de mettre en évidence certains facteurs physiologiques de variation de l'activité LPL du lait de chèvre (animal, stade de lactation, stade de traite, sous-alimentation).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les chèvres utilisées dans cette expérience sont placées soit sur caillebotis, en stabulation entravée, soit sur paille, en stabulation libre. Elles reçoivent du foin de luzerne à volonté et de l'aliment concentré à base d'orge, avoine, tourteau de soja, minéraux et vitamines (600 g/j + 300 g par kg de lait au-dessus d'une production de 2 kg). Quatorze chèvres participent à l'expérience entre la mise bas et la 29^e^ semaine de lactation. En raison de contraintes d'élevage, le dispositif expérimental n'est équilibré que pour 7 chèvres entre la parturition et la 3^e^ semaine de lactation et pour 6 autres chèvres entre la 2^e^ et la 14^e^ semaine de lactation.

La traite est effectuée mécaniquement à 6 h et 17 h. Le colostrum et le lait de début ou de fin de traite sont cependant prélevés manuellement. Le lait est généralement recueilli à la traite du soir, aussitôt filtré et congelé. L'activité LPL du lait est mesurée dans les conditions précédemment décrites par CHILLIARD et FEHR (1976).

L'analyse statistique de l'évolution des activités lipolytiques en fonction du stade de lactation n'est effectuée que lorsque le dispositif expérimental est équilibré. Elle consiste en une analyse de variance comportant une régression de l'activité sur le temps (LISON, 1958).

RÉSULTATS

1. — *Variations individuelles et variations liées au stade de lactation*

L'ensemble des résultats de production laitière et d'activité lipolytique obtenus à partir de 14 chèvres, sont représentés sur la figure 1. Une activité lipolytique est présente dans le colostrum et le lait et elle tend à augmenter linéairement avec le stade de lactation, même lorsque la production laitière commence à diminuer. Les productions laitières et les activités LPL ne sont pas corrélées, alors qu'une corrélation de — 0,5 (n = 48) existe entre les taux butyreux et les activités LPL des laits (le taux butyreux diminuant en début de lactation). Toutefois, les corrélations intra-stade de lactation entre le taux butyreux ou la production laitière d'une part, et l'activité LPL d'autre part, sont nulles.

L'analyse des régressions linéaires (fig. 2) montre que, pour les périodes étudiées, l'activité lipolytique augmente très significativement avec le stade de lactation (P < 0,001) et que cette évolution n'est pas significativement différente d'une augmentation linéaire. Les résultats correspondant à une chèvre malade en cours d'expérience n'ont pas été pris en considération. Les différences entre chèvres sont significatives (P < 0,05 et P < 0,01), comme le suggère l'amplitude des erreurs-types (fig. 2).

Les activités lipolytiques des laits de deux chèvres, mesurées entre la 22^e^ et la 29^e^ semaine de lactation au cours de deux lactations successives, présentent des différences d'une année sur l'autre de 5 et 12 %, c'est-à-dire du même ordre de grandeur que les variations hebdomadaires observées durant quatre semaines consécutives pour une de ces chèvres.

2. — *Activité lipolytique du lait de début et de fin de traite*

Du lait représentant le premier et le dernier quart de la traite est prélevé sur deux chèvres. Les activités lipolytiques du lait de début et de fin de traite sont respectivement de 48,9 et 51,8 µEq AG/h/ml [1] pour une chèvre et de 49,4 et 49,3 µEq AG/h/ml pour la seconde.

[1] 1 µEq AG/h/ml = 1 µEq d'acides gras libérés par heure et par ml de lait.

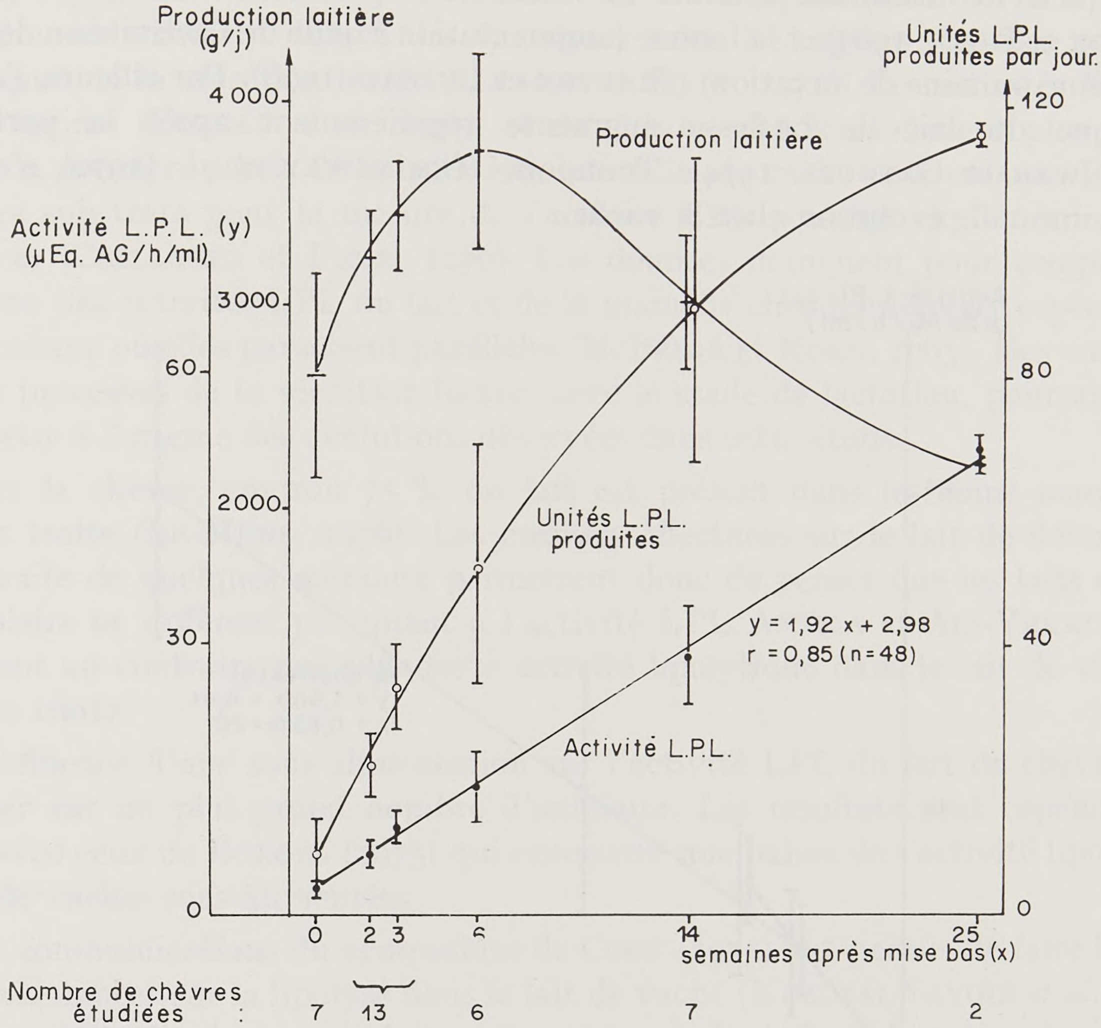


FIG. 1. — *Influence du stade de lactation sur la production laitière, l'activité LPL du lait et l'activité LPL produite par jour*

Les moyennes (± erreur-type) sont représentées. La première mesure correspond au colostrum de la deuxième traite, effectuée moins de 24 h après la mise bas. L'unité LPL est ici de 1 mEq AG/h.

3. — *Variations observées au cours de la sous-alimentation*

Le jeûne semble avoir un effet sur l'activité lipolytique du lait puisque celle-ci était de 2,4 μEq AG/h/ml pour une chèvre ayant jeûné 36 heures en quatorzième semaine de lactation et de 32,3 μEq AG/h/ml après 6 jours de réalimentation.

Une chèvre dont le niveau de consommation a subitement baissé à partir de la 10ᵉ semaine de lactation a présenté une forte chute de l'activité LPL entre la 6ᵉ et la 14ᵉ semaine.

DISCUSSION

Les activités lipolytiques du lait de vache agissant sur la tributyrine et sur des substrats « lipoprotéiques » sont dues essentiellement à une seule enzyme (HOYNES et DOWNEY, 1973; CASTBERG *et al.*, 1975) ayant des caractéristiques de LPL (OLIVECRONA *et al.*, 1975). Le terme activité lipolytique du lait de vache sera donc utilisé dans cette discussion indépendamment du type de substrat utilisé pour sa mesure.

Une augmentation de l'activité LPL du lait avec le stade de lactation, observée ici chez la chèvre jusqu'en 14ᵉ-25ᵉ semaine de lactation, se produit aussi chez le

cobaye (activité maximale atteinte au cours de la première semaine de lactation) (McBRIDE et KORN, 1963) et la femme (augmentation rapide de l'activité en deuxième et troisième semaine de lactation) (ODIEVRE et LUZEAU, 1976). Par ailleurs, l'activité lipolytique du lait de buflesse augmente régulièrement après la parturition (SAMMANWAR et GANGULI, 1974). Toutefois, HEMINGWAY *et al.* (1970) n'ont pas observé une telle évolution chez la vache.

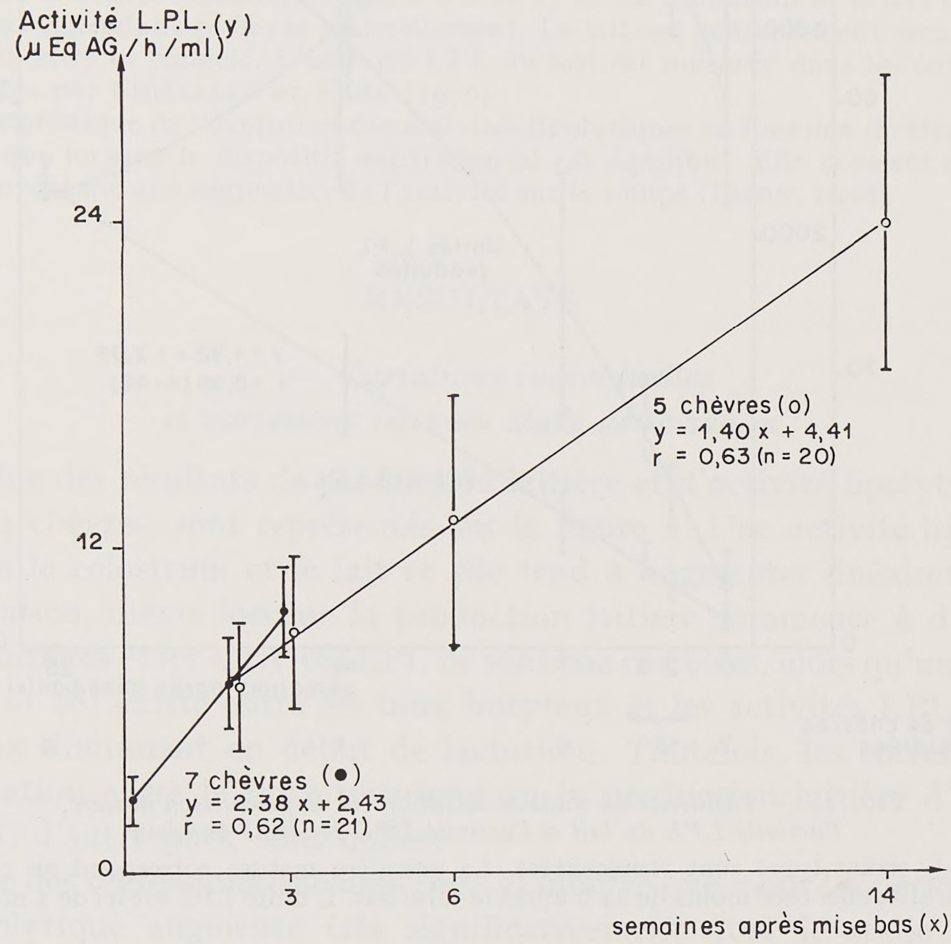


FIG. 2. — *Évolution de l'activité LPL du lait en début de lactation*

Les moyennes (± erreur-type) des activités enregistrées sur 7 chèvres (0 à 3 semaines), (•) et 5 chèvres (2 à 14 semaines après la mise bas), (o) sont représentées. L'effet du temps et l'effet individuel (chèvre) sont significatifs dans les deux cas.

D'importantes variations individuelles et journalières des activités LPL ou lipolytiques ont également été mises en évidence dans les laits de femme (HERNELL et OLIVECRONA, 1974; LUZEAU *et al.*, 1975; ODIEVRE et LUZEAU, 1976) et de vache (ASKEW *et al.*, 1970; RAO *et al.*, 1973; CASTBERG *et al.*, 1975; ANTILA et ALI-YRKKO, 1975, BORGES, 1975). En revanche, l'activité LPL du lait de chèvre est relativement constante d'une lactation à l'autre. Ce résultat devra cependant être confirmé sur un plus grand nombre d'animaux et pourrait avoir des implications pratiques (caractérisation des animaux).

La LPL intervenant dans le prélèvement par la mamelle des acides gras des triglycérides circulants est située dans l'endothélium des capillaires sanguins (LINZELL, 1974). La présence en très grande quantité de cette enzyme dans les laits de vache (KORN, 1962) et de cobaye (McBRIDE et KORN, 1963) suggère qu'elle pourrait être aussi présente dans les cellules épithéliales qui se rompent pendant la sécrétion lactée. Par ailleurs, le lait de ratte contient très peu de LPL (HAMOSH

et Scow, 1971), contrairement à la mamelle de cette espèce (Hamosh *et al.*, 1970). Ces différences semblent dues à des variations selon les espèces dans les processus cytologiques de la sécrétion lactée (Hamosh et Scow, 1971). Les activités LPL des laits de femme (Luzeau *et al.*, 1975) et de chèvre sont sensiblement plus faibles, pendant la première partie de la lactation, que celles de vache et de cobaye. L'emploi de divers substrats pour la mesure de l'activité LPL pourrait expliquer certaines différences (Chilliard et Fehr, 1976). Les données manquent pour comparer les évolutions des activités LPL du lait et de la mamelle chez les diverses espèces, sauf chez le cobaye où elles paraissent parallèles (McBride et Korn, 1963). Des variations dans les processus de la sécrétion lactée, avec le stade de lactation, pourraient par ailleurs être à l'origine des évolutions observées dans cette étude.

Chez la chèvre, environ 75 % du lait est présent dans les sinus mammaires avant la traite (Le Mens, 1976). Les mesures effectuées sur le lait de début et de fin de traite de quelques animaux permettent donc de penser que les laits citernal et alvéolaire ne diffèrent pas quant à l'activité LPL. Antila et Ali-Yrkko (1975) rapportent au contraire une plus forte activité lipolytique dans le lait de vache en début de traite.

L'influence d'une sous-alimentation sur l'activité LPL du lait de chèvre est à confirmer sur un plus grand nombre d'animaux. Les résultats sont cependant en accord avec ceux de Borges (1975) qui enregistre une baisse de l'activité lipolytique du lait de vaches sous-alimentées.

Les communications du symposium de Cork (1975) ont permis de faire le point des connaissances sur la lipolyse dans le lait de vache (Kuzdzal-Savoie *et al.*, 1975). La susceptibilité lipolytique du lait peut varier avec le stade de lactation, la quantité de lait produite, l'alimentation et des facteurs physiologiques encore mal connus (Jellema et Schipper, 1975). La liaison entre l'activité lipasique, mesurée *in vitro*, des laits de vache et la lipolyse spontanée ayant lieu dans ces laits est peu étroite car la lipolyse résulte, en plus de la présence de lipase, de la susceptibilité des globules gras et de l'équilibre entre des facteurs inhibiteurs et activateurs de la lipolyse présents dans le lait (Deeth et Fitz-Gerald, 1975). Dans le lait de femme, le facteur limitant de la lipolyse spontanée est l'activité LPL, alors qu'une autre lipase, stimulée par les sels biliaires, est présente en excès (Luzeau *et al.*, 1975; Olivecrona *et al.*, 1975). La relation entre lipase et lipolyse n'a pas été étudiée jusqu'ici dans le lait de chèvre. La connaissance des variations physiologiques de l'activité LPL peut contribuer à l'analyse des phénomènes de lipolyse spontanée intense qui existent dans le lait de cette espèce (Chilliard et Luzeau, résultats non publiés). Il est à noter que la lipolyse spontanée dans le lait de vache augmente au cours de la lactation.

CONCLUSION

Cette étude montre que l'activité LPL du lait de chèvre augmente fortement pendant la première partie de la lactation, présente un important facteur individuel

et semble être affectée par l'état nutritionnel. Par contre, elle semble peu varier au cours de la traite et être assez stable d'une lactation à l'autre.

Un certain nombre de questions découle de ces observations : la LPL a-t-elle un rôle essentiel dans la lipolyse spontanée du lait de chèvre ou bien n'agit-elle que lorsque diverses conditions sont réunies ? Les variations de l'activité LPL du lait au cours de la lactation suivent-elles les variations de l'activité LPL de la mamelle ou bien reflètent-elles une évolution des processus de sécrétion lactée ? Le lait est-il la source d'une fraction particulière de la LPL mammaire ? Cette enzyme est-elle synthétisée dans les cellules sécrétrices de lait ? La LPL du lait peut-elle servir d'indicateur du patrimoine génétique ou de l'état nutritionnel de l'animal ? Des investigations sont entreprises dans ce laboratoire pour tenter de répondre à certaines de ces questions.

Reçu pour publication en novembre 1976.

ADDENDUM

Alors que cet article était sous presse, nous avons pris connaissance de l'étude norvégienne sur l'activité lipolytique et L.P.L. du lait de chèvre de BJORKE K. et CASTBERG H. B. (1976, Lipolytic activity in goat's milk, Nordeuropaeisk Mejeri-Tidsskrift, **8**, 296-304). Les caractéristiques et les variations physiologiques de l'activité L.P.L., observées par ces auteurs et par nous-mêmes, sont généralement très voisines. Toutefois, BJORKE et CASTBERG n'ont pas observé de tendance à l'augmentation de l'activité L.P.L. des laits des différentes chèvres, au cours des quatre premiers mois de la lactation, alors qu'ils enregistrent de fortes variations individuelles et d'un prélèvement à l'autre.

SUMMARY

GOAT MILK LIPOLYTIC ACTIVITY
II. — INFLUENCE OF SOME PHYSIOLOGICAL FACTORS ON THE LIPOPROTEIN LIPASE ACTIVITY

Goat milk lipoprotein lipase activity is strongly increasing during the first 25 weeks of the lactation. The activity of milk of different individual goats is variable and seems to be reduced by underfeeding or fasting. The values of this activity are similar at the beginning and at the end of the milking and appear as being stable from one lactation to the following one.

It is suggested that these results may have some practical implications in the field of dairy technology and animal physiology.

RESUMEN

ACTIVIDAD LIPOLITICA DE LA LECHE DE CABRA
II. — ALGUNAS VARIACIONES FISIOLOGICAS DE LA ACTIVIDAD LIPOPROTEINA-LIPASICA

La actividad lipoproteina-lipasica de la leche de cabra aumenta en gran proporcion hasta la 25ª semana de lactacion. Esta actividad es diferente de un animal a otro en el mismo estado de la lactacion y parece que disminuye mediante la subalimentacion o el ayuno. Los valores de esta actividad son muy similares al comienzo y al fianl del ordeno y parece que son estables de una lactacion a otra.

Las implicaciones practicas que pueden tener estos resultados en la tecnologia lechera y en la fisiologia animal siguen estando en tela de juicio.

RIASSUNTO

ATTIVITA' LIPOLITICA DEL LATTE DI CAPRA II. — ALCUNE VARIAZIONI FISIOLOGICHE DELL'ATTIVITA LIPOPROTEINA LIPASICA

L'attività lipoproteina-lipasica del latte di capra aumenta fortemente fino alla 25ª settimana di lattazione. Essa differisce da un animale all'altro allo stesso stadio di lattazione e sembra sia ridotta dalla scarsa alimentazione o dal digiuno. I valori di quest'attività sono molto vicine all'inizio e alla fine della mungitura e appaiono stabili da una lattazione all'altra.

Vengono discussi infine le implicazioni pratiche che potrebbero avere questi risultati per quanto riguarda la tecnologia del latte e la fisiologia animale.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANTILA M. et ALI-YRKKO S., 1975. Milk lipase activity. In « Proceedings of the lipolysis symposium - Cork ». *Fed. Int. Laiterie. Document* nº **86**, 58-60.

ASKEW E. W., EMERY R. S. et THOMAS J. W., 1970. Lipoprotein lipase of the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **53**, 1415-1423.

BORGES M. S., 1975. Milk flavors, lipase activity, and milk production as related to suden changes of energy in the cow's ration. *Dissert. Abstr. Int.*, **35**, 4733-B.

CASTERG H. B., EGELRUD T., SOLBERG P. et OLIVECRONA T., 1975. Lipases in bovine milk and the relationship between the lipoprotein lipase and tributyrate hydrolysing activities in cream and skim-milk. *J. Dairy Res.*, **42**, 255-266.

CHILLIARD Y. et FEHR P. M., 1976. Activité lipolytique du lait de chèvre. I. Mise en évidence d'une activité lipoprotéine-lipasique. *Ann. Techn. agric.* **25**, 219-230.

DEETH H. C. et FITZ-GERALD C. H., 1975. Factors governing the susceptibility of milk to spontaneous lipolysis. In « Proceeding of the lipolysis symposium - Cork ». *Fed. Int. Laiterie. Document* nº **86**, 24-34.

HAMOSH M., CLARY T. R., CHERNICK S. S. et SCOW R. O., 1970. Lipoprotein lipase activity of adipose and mammary tissue and plasma triglyceride in pregnant and lactating rats. *Biochim. Biophys. Acta*, **210**, 473-482.

HAMOSH M. et SCOW R. O., 1971. Lipoprotein lipase activity in guinea pig and rat milk. *Biochim. Biophys. Acta*, **231**, 283-289.

HEMINGWAY E. B., SMITH G. H., ROOK J. A. F., et O'FLANAGAN N. C., 1970. Lipase taint. *J. Soc. Dairy Techn.*, **23**, 44-48.

HERNELL O. et OLIVECRONA T., 1974. Human milk lipases. I. Serum-stimulated lipase. *J. Lipid Res.*, **15**, 367-374.

HOYNES M. C. T. et DOWNEY W. K., 1973. Relationship of the lipase and lipoprotein lipase activities of bovine milk. *Biochem. Soc. Transact.*, **1**, 256-259.

JELLEMA A. et SCHIPPER C. J., 1975. Influence of physiological factors on the lipolytic susceptibility of milk. In « Proceedings of the lipolysis symposium - Cork ». *Fed. Int. Laiterie. Document* nº **86**, 2-6.

KORN E. D., 1962. The lipoprotein lipase of cow's milk. *J. Lipid. Res.*, **3**, 246-250.

KUZDZAL-SAVOIE S., AUCLAIR J. E., MOURGUES R. et LANGLOIS D., 1975. La lipolyse dans le lait refroidi. *Le lait*, **548**, 530-543.

LE MENS P., 1976. Où en est la traite des chèvres ? *L'élevage*, nº hors série, « *Moutons et chèvres* », p. 115-119.

LINZELL J. L., 1974. Mammary blood flows and methods of identifying and measuring precursors of milk. In LARSON B. L., SMITH V. R. : *Lactation, a comprehensive treatise*, 143-225. Acad. Press, N. Y., London.

LISON L., 1958. Statistique appliquée à la biologie expérimentale (Gauthier-Villars, Ed.).

LUZEAU R., ODIEVRE M., LEVILLAIN P. et LEMONNIER A., 1975. Activité de la lipoprotéine-lipase dans les laits de femme inhibiteurs *in vitro* de la conjugaison de la bilirubine. *Clin. Chim. Acta*, **59**, 133-138.

MCBRIDE O. W. et KORN E. D., 1963. The lipoprotein lipase of mammary gland and the correlation of its activity to lactation. *J. Lipid. Res.*, **4**, 17-23.

ODIEVRE M. et LUZEAU R., 1976. Communication personnelle.

OLIVECRONA T., EGELRUD T., HERNELL O., CASTBERG H. et SOLBERG P., 1975. Is there more than one lipase in bovine milk ? In « Proceedings of the lipolysis symposium - Cork ». *Fed. Int. Laiterie Document* nº **86**, 61-72.

RAO D. R., HAWKINS G. E. et SMITH R. C., 1973. Effect of glucose and insulin on lipoprotein lipase activity in adipose tissue and milk. *J. Dairy Sci.*, **56**, 1415-1419.

SAMMANWAR R. D. et GANGULI N. C., 1974. La lipase du lait de buflesse. *19e Congrès Int. Laiterie. New-Dehli*, **1** F, 380.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (3), 239-251.

INFLUENCE DE LA FERMENTATION CONTINUE SOUS PRESSION DE CO_2 SUR LA COMPOSITION DES VINS DESTINÉS A LA DISTILLATION

T. IVANOV et M. MARINOV

Institut supérieur des Industries alimentaires,
Lenin 26, Plovdiv, Bulgarie

RÉSUMÉ

La fermentation du moût de raisin en continu sous pression de CO_2 a été réalisée durant les vendanges 1971, 1972 et 1973. A l'aide d'une installation semi-industrielle, la vitesse de fermentation et la composition des vins ont été comparées à celles des vins produits par fermentation discontinue.

Par rapport à la teneur en constituants volatils, la fermentation en continu, sous pression de CO_2, fournit des vins destinés à la distillation, riches en esters et en acides volatils et pauvres en alcools supérieurs et en aldéhydes. Cette fermentation modifie aussi certains groupes de constituants non volatils : matières azotées, substances phénoliques et acides.

INTRODUCTION

Dans la production de vins de distillation, la méthode de vinification discontinue est généralement utilisée. Or, dernièrement, dans plusieurs pays, U.R.S.S., Bulgarie, Italie, on a adopté des installations à fermentation continue pour la fabrication de vins blancs.

A priori, ces mêmes installations peuvent également servir à la production de vins de distillation. Elles se divisent en deux groupes : celles fonctionnant sous pression atmosphérique et celles fonctionnant sous pression de CO_2.

L'application de la fermentation sous pression de CO_2 marque une évolution dans la pratique de la fermentation continue (IVANOV, 1972). En l'adaptant, on a résolu les problèmes de l'accélération de la fermentation, de l'automatisation des processus de vinification et de l'utilisation de souches de levures appropriées.

Quant aux problèmes concernant les modifications du métabolisme des levures et la formation de produits secondaires résultant de la fermentation, ils ne sont pas

encore résolus, quoiqu'ils présentent une importance capitale pour la production de vins de distillation et des eaux-de-vie de vin (NILOV *et al.*, 1967).

Jusqu'à présent, les installations bulgares pour la fermentation continue sans pression (DASKALOV, GARABEDIAN *et al.*, 1963), et sous pression de CO_2 (IVANOV, PETROV *et al.*, 1971) ne sont pas utilisées pour la production de vins de distillation.

En Union Soviétique, en Moldavie (MALTABAR *et al.*, 1971), l'installation V-K-S est utilisée dans quelques caves pour la production de vins de distillation. Elle est munie d'une colonne de distillation et permet le traitement de la vendange, la vinification et la distillation en continu.

A Tirapol, NATCHEVA *et al.*, (1974) ont étudié les possibilités d'enrichissement de vins de distillation en constituants aromatiques par la pratique de la fermentation continue.

Tenant compte des résultats positifs obtenus en U.R.S.S. par la pratique de la méthode de fermentation continue dans la production de vins de distillation, de l'absence d'essais dans ce domaine en Bulgarie et des avantages intéressants sur divers points de cette méthode comparativement à la méthode classique, nous nous sommes fixés d'étudier les possibilités d'application de la fermentation continue sous pression de CO_2 pour l'élaboration de vins de distillation.

MÉTHODE ET MATÉRIEL

Pour nos essais, nous avons utilisé l'installation semi-industrielle qui fonctionne à la cave expérimentale de Vinzavod, Targoviche (fig. 1). Elle est constituée de :

1° Récipients de jus de raisin, H_1, H_2.

2° Fermenteurs $\varnothing_1$, $\varnothing_2$, $\varnothing_3$, $\varnothing_1$I, $\varnothing_2$I, $\varnothing_3$I, $\varnothing_4$, $\varnothing_5$, $\varnothing_6$.

3° Récipients de levures, D_1, D_2.

4° Système de récupération et compression de CO_2.

Le volume des récipients H_1, H_2 ainsi que le volume des fermenteurs est de 250 litres.

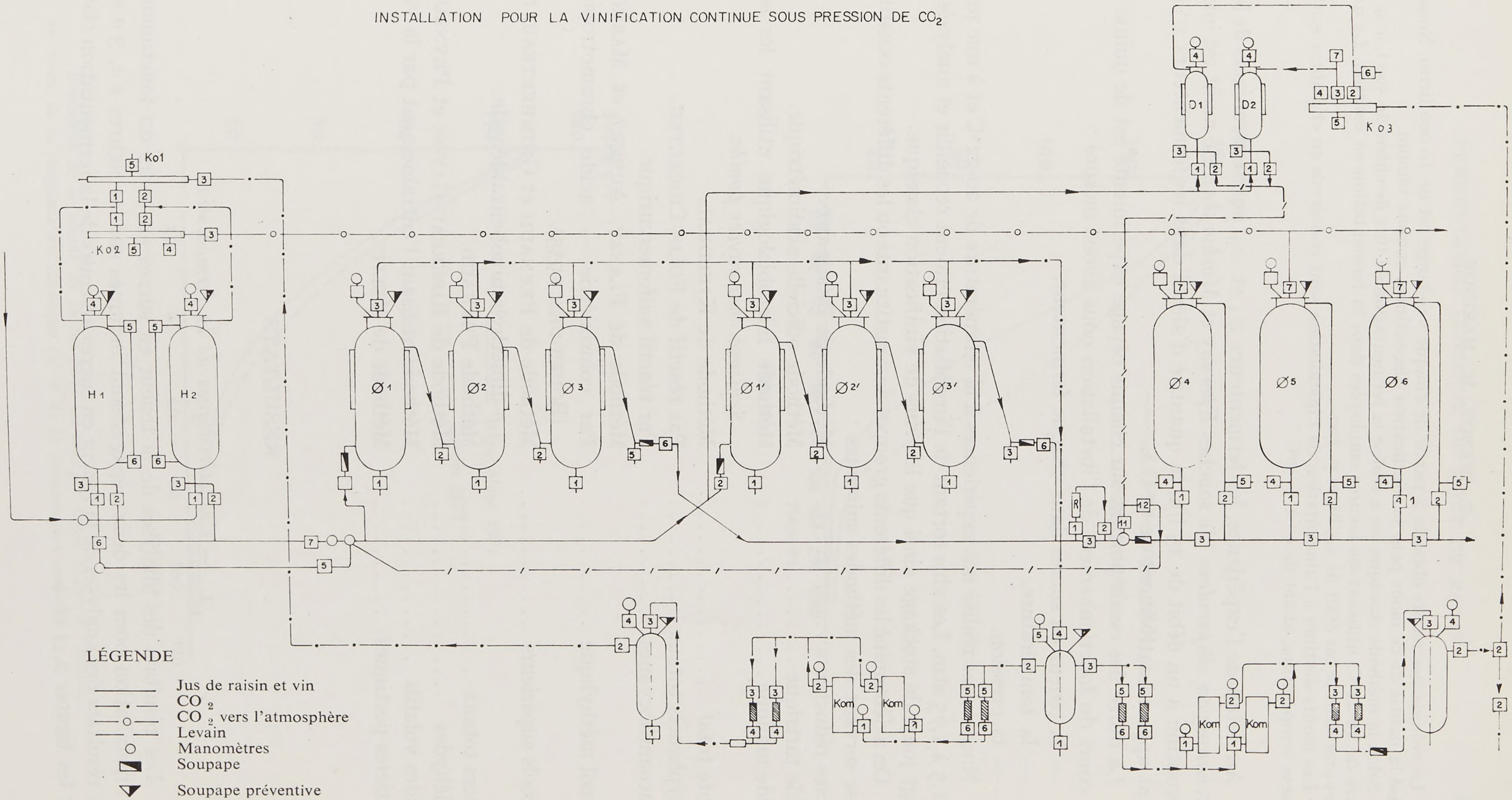
Le moût servant aux essais provient des cépages *Dimiat* et *Ugni blanc*. Le tableau 1 indique la composition des moûts qui ont servi à nos essais pendant les vendanges 1971, 1972 et 1973.

TABLEAU I

Composition des moûts des cépages Dimiat *et* Ugni blanc

	Dimiat			*Ugni blanc*		
	1971	1972	1973	1971	1972	1973
Sucres (g/l)	175,4	178,2	178,9	169,8	166,2	164,2
Acidité totale (g/l), acide tartrique	9,83	8,40	6,46	9,92	8,55	8,27
pH	2,95	3,10	3,12	2,90	3,00	3,02
Viscosité cp.	1,805	1,841	1,802	1,720	1,778	1,730
Acide tartrique (g/l)	6,03	5,80	3,64	6,08	4,68	5,02
Acide malique (g/l)	3,41	2,68	2,84	3,80	3,92	3,72
Azote (mg/l)	423	473	328	452	575	373
Polyphénols (mg/l)	380	420	352	660	364	540
Leucoanthocyannes (mg/l)	84,36	46,40	49,88	124,48	57,20	84,88
Alcool méthylique (mg/l)	36,2	88,0	50,4	46,4	98,0	64,4
Matières pectiques (g/l)	0,97	0,64	1,25	1,51	0,51	1,66
SO_2 total (mg/l)	25,60	6,84	24,40	16,84	25,60	6,08

FIG. 1. — *Schéma de l'installation semi-industrielle*



Le volume des moûts obtenus à partir de chaque vendange est de 10 000 litres. Nous avons utilisé la moitié de ce moût pour la vinification discontinue, comme témoin.

Selon la méthode classique, on a réalisé la fermentation en fûts de chêne de 500 l, à la température de 20-22°C, utilisant les levures employées dans la fermentation en continu. La quantité de levures dans le cas était de 2,5 litres p. 100.

Les moûts destinés à l'alimentation de l'installation sont conservés en chambres isothermes à basse température, allant de 0° à + 2°C.

Au début de l'expérience, les fermenteurs $\varnothing_1$ et $\varnothing_1'$ sont ensemencés de levures *Saccharomyces ellipsoideus* (de souches *Epernay* et *Moskovska*). Le moût est introduit en continu à un débit de 15 l/h, la quantité d'alcool dans les fermenteurs $\varnothing_1$ et $\varnothing_1'$ étant approximativement de 4° G.L.

La durée des essais portant sur chaque cépage expérimenté est de quinze jours. Au cours du fonctionnement de l'installation nous avons mesuré :

— la teneur en sucres dans chaque fermenteur,
— la température,
— la pression.

Nous avons réalisé nos expériences à la température de 20-22°C et à une pression de 1,5 à 1,75 atm. Les vins sortant de l'installation étaient recueillis et analysés après vingt jours de stockage ainsi que les vins de vinification classique.

On a déterminé les différents groupes de constituants ou les différents constituants en se servant des méthodes suivantes :

Sucres réducteurs	Méthode de BERTRAND.
Acide tartrique	Méthode officielle acidimétrique.
Acide malique	Méthode microbiologique utilisant les levur *Schizosaccharomyces pombe*.
Azote total	Méthode de KJELDHAL.
Polyphénols totaux	Par réactif de FOLIN-CIOCALTEU.
Leucoanthocyanes	Par réactif sulfomercurique.
	Méthode de FLANZY, AUBERT et MARINOV.
Alcool méthylique	Par colorimétrie — acide chromotropique (BOUZIGUES, 1955).
Alcools supérieurs	Méthode de PEYNAUD et GUIMBERTEAU, réactif *p*-diméthylaminobenzaldéhyde.
Esters totaux	Méthode PEYNAUD.
Aldéhydes	Méthode de RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD.
Acides volatils	Méthode utilisant l'entraînement par la vapeur.
Matières pectiques	Méthode de MELITS.

RÉSULTATS

1. — *Caractéristiques de la fermentation*

Les résultats des analyses de la teneur en sucres au cours du fonctionnement de l'installation pour les deux cépages sont indiqués sur les figures 2 *a*, 3 *a* et 4 *a*. Les résultats des analyses de la teneur en sucres au cours de la fermentation classique sur les figures 2, 3 et 4.

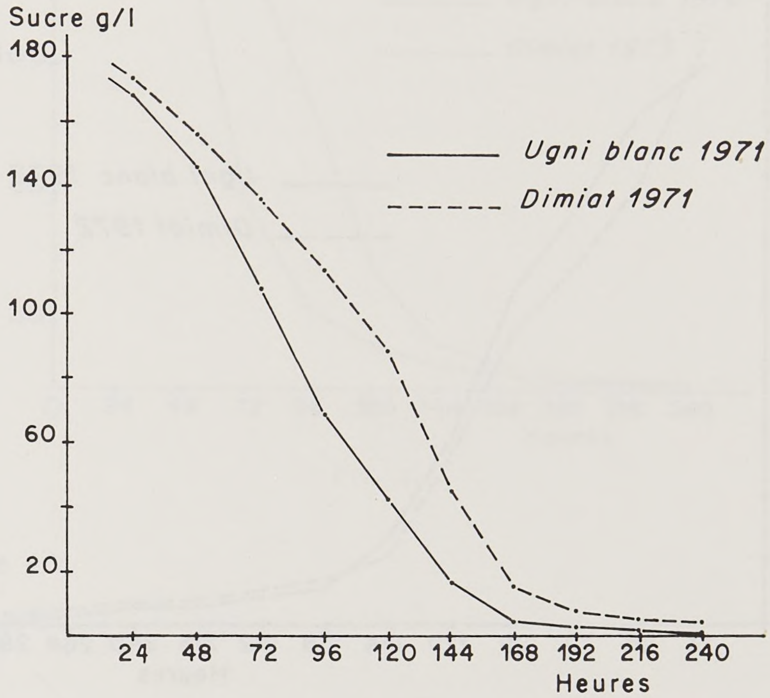


FIG. 2.

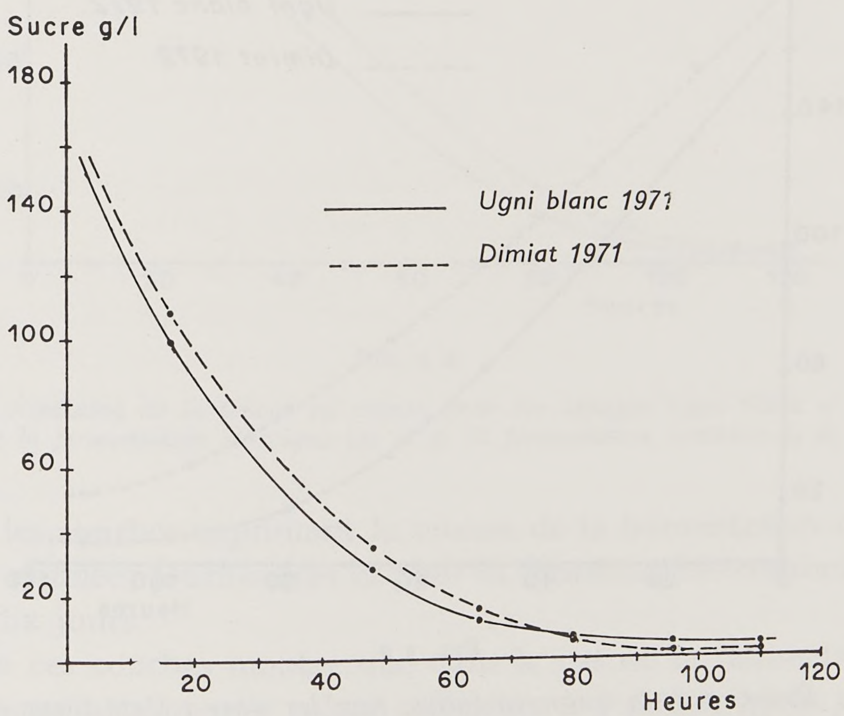


FIG. 2 a

Évolution de la teneur en sucres pour les cépages Ugni blanc *et* Dimiat, *au cours de la fermentation classique* (2) *et de la fermentation continue* (2 *a*) *en 1971*

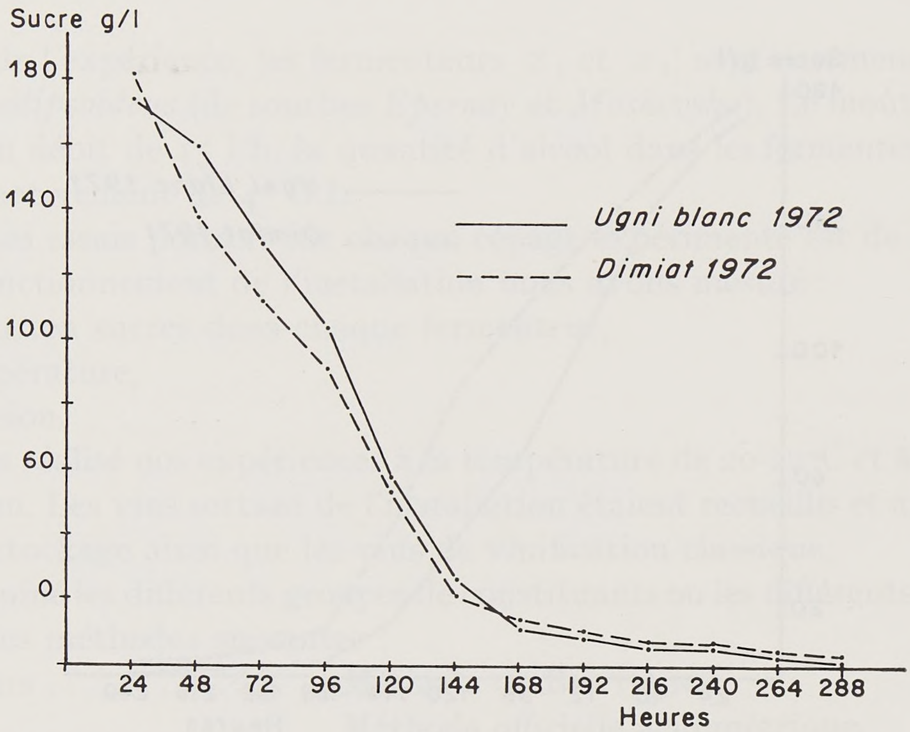


FIG. 3.

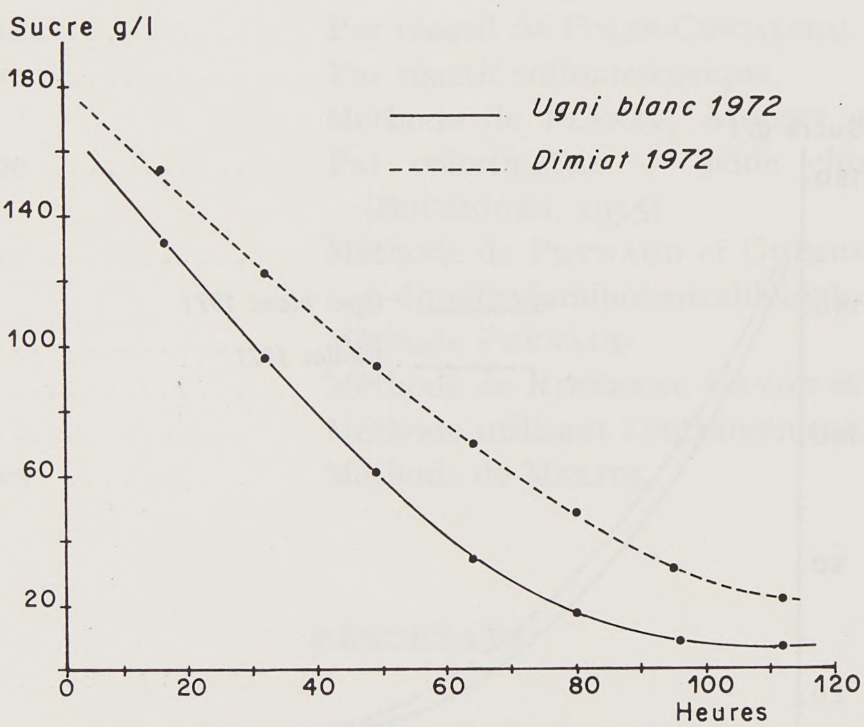


FIG. 3 a.

Évolution de la teneur en sucres, pour les cépages Ugni blanc *et* Dimiat, *au cours de la fermentation classique* (3) *et de la fermentation continue* (3 *a*) *en 1972*

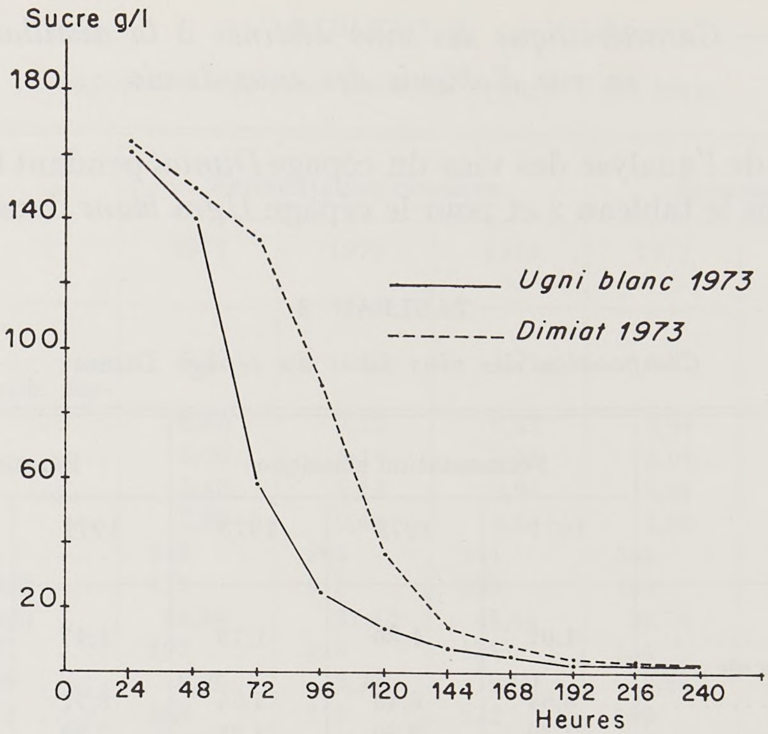


FIG. 4.

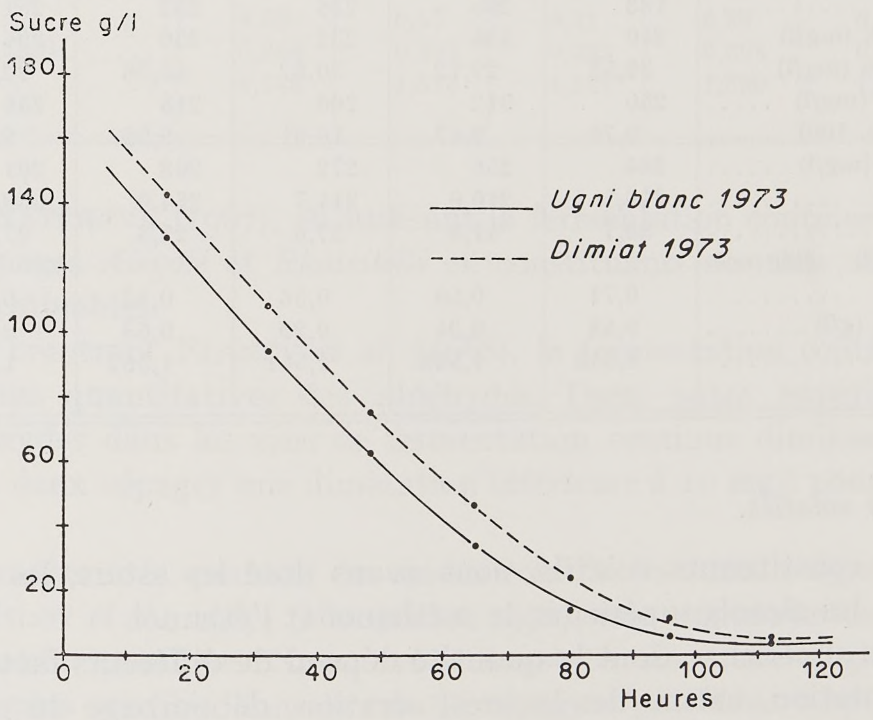


FIG. 4 a.

Évolution de la teneur en sucres, pour les cépages Ugni blanc *et* Dimiat, *au cours de la fermentation classique* (4) *et de la fermentation continue* (4 *a*) *en 1973*

Pour tracer les courbes exprimant la vitesse de la fermentation classique, nous avons utilisé des données journalières et pour la fermentation continue des données moyennes pour dix jours.

L'examen de ces courbes montre que dans le cas de la fermentation classique la quantité de sucres atteint une valeur inférieure à 2 p. 100 après 130-140 heures pour le cépage *Dimiat* et après 120-156 heures pour l'*Ugni blanc*. Dans le cas de la fermentation continue, ce temps est beaucoup plus réduit. Pour le cépage *Dimiat*, 60-100 heures et pour *Ugni blanc*, 55-75 heures.

2. — *Caractéristique des vins destinés à la distillation en vue d'obtenir des eaux-de-vie*

Les résultats de l'analyse des vins du cépage *Dimiat* pendant les trois vendanges sont présentés dans le tableau 2 et pour le cépage *Ugni blanc* dans le tableau 3.

TABLEAU 2

Composition des vins issus du cépage Dimiat

	Fermentation classique			Fermentation continue		
	1971	1972	1973	1971	1972	1973
Sucres (g/l)	1,02	1,80	1,73	1,17	1,53	1,63
Acidité totale (g/l), acide tartrique	8,64	6,45	5,54	8,72	6,82	5,64
pH	3,30	3,30	3,22	3,28	3,15	3,15
Acide tartrique (g/l)	5,60	3,42	2,90	5,74	3,85	3,08
Acide malique (g/l)	2,84	3,11	2,01	2,80	3,40	2,10
Azote (mg/l)	183	265	236	252	281	284
Polyphénols totaux (mg/l)	240	336	232	230	294	220
Leucoanthocyannes (mg/l)	39,53	29,12	30,82	45,76	22,46	20,81
Alcool méthylique (mg/l)	250	312	200	218	256	168
Alcool éthylique (p. 100)	9,76	9,67	10,01	9,92	9,92	10,17
Alcools supérieurs (mg/l)	384	256	272	268	201	192
Esters (mg/l)	246,4	210,0	214,7	264,0	332,4	272,6
Aldéhydes (mg/l)	30,7	41,8	27,6	28,8	37,4	20,4
Acides volatils (g/l), acide acétique	0,71	0,50	0,36	0,82	0,57	0,41
Matières pectiques (g/l)	0,48	0,34	0,29	0,63	0,39	0,38
Viscosité cp.	1,548	1,548	1,541	1,562	1,591	1,541

a) *Constituants volatils.*

Parmi les constituants volatils, nous avons dosé les esters, les aldéhydes, les acides volatils, les alcools supérieurs, le méthanol et l'éthanol.

Les alcools supérieurs, dont la quantité dépend de différents facteurs (température de fermentation, nature des levures, aération, débourbage du moût, quantité de sucres, acidité, nature de la source azotée) présentent un intérêt particulier pour les vins de distillation ; leurs esters jouent également un rôle important dans l'arôme des vins.

Si l'on compare les teneurs en alcools supérieurs des vins obtenus par la méthode classique et par la méthode en continu sous pression de CO_2, on constate une diminution de la teneur en alcools supérieurs dans les vins vinifiés en continu. Pour le cépage *Dimiat,* cette diminution est de 30,2 p. 100, 21,5 p. 100 et 29,4 p. 100 et pour *Ugni blanc* 33,2 p. 100, 22,3 p. 100, 31,0 p. 100.

Les résultats rapportés dans les tableaux 2 et 3 montrent une augmentation des esters dans les vins de fermentation continue. L'augmentation varie dans les limites de 27,6 mg/l à 68,5 mg/l pour le cépage *Ugni blanc* et de 18,0 à 122 mg/l pour le cépage *Dimiat.*

TABLEAU 3

Composition des vins issus du cépage Ugni blanc

	Fermentation classique			Fermentation continue		
	1971	1973	1973	1971	1972	1973
Sucres (g/l)	1,37	1,13	1,71	1,52	1,48	1,61
Acidité totale (g/l), acide tartrique	8,80	7,22	6,62	8,98	7,28	6,87
pH	3,00	3,18	3,08	3,04	3,05	3,02
Acide tartrique (g/l)	5,60	4,17	3,96	5,81	4,42	4,20
Acide malique (g/l)	2,80	2,46	2,16	2,80	2,54	2,21
Azote (mg/l)	248	204	241	303	261	287
Polyphénols totaux (mg/l)	424	315	390	284	287	370
Leucoanthocyannes (mg/l)	48,88	31,82	46,44	38,74	28,49	64,6
Alcool méthylique (mg/l)	192	388	154	154	238	121
Alcool éthylique (p. 100)	9,26	9,30	9,10	9,50	9,42	9,20
Alcools supérieurs (mg/l)	288	242	232	192	188	160
Esters (mg/l)	218,8	160,3	205,0	246,4	288,8	234,1
Aldéhydes (mg/l)	44,6	44,0	41,2	38,4	39,6	36,1
Acides volatils (g/l), acide acétique	0,69	0,47	0,31	0,80	0,64	0,43
Matières pectiques (g/l)	0,368	0,397	0,385	0,698	0,488	0,444
Viscosité cp.	1,518	1,518	1,521	1,520	1,540	1,541

NILOV et NATCHEVA (1967), en utilisant la fermentation continue pour enrichir les vins des cépages *Aligoté* et *Rkatsitelli* en constituants aromatiques, ont obtenu des résultats semblables.

Comme le montrent FLANZY *et al.* (1968), la fermentation continue provoque des modifications quantitatives des aldéhydes. Dans notre expérimentation, la teneur en aldéhydes dans les vins de fermentation continue diminue. Nous avons trouvé pour les deux cépages une diminution inférieure à 10 mg/l pour les trois vendanges.

En ce qui concerne la quantité des acides volatils, les auteurs signalent (FLANZY *et al.*, 1968), (NILOV *et al.*, 1967) (MNDJOIAN, 1972), une augmentation sensible pendant la vinification continue. Nous avons constaté aussi une augmentation des acides volatils, plus sensible dans le cas de cépage *Ugni blanc* 0,17 g/l, vendange 1972, et pour le cépage *Dimiat* (0,05 g/l), vendange 1973.

Selon FLANZY et BOUZIGUES (1959), la fermentation alcoolique modifie très peu la teneur en alcool méthylique. Nos expériences montrent que la fermentation continue influe sensiblement sur la quantité d'alcool méthylique. La diminution moyenne pour le cépage *Dimiat* est de 15,6 p. 100 et pour l'*Ugni blanc* de 26,6 p. 100 par rapport aux vins obtenus par la méthode classique.

La fermentation continue sous pression de CO_2 présente un intérêt du point de vue de la transformation des sucres et de l'accumulation de l'alcool. On constate toujours que la production d'alcool éthylique au cours de la vinification en continu est plus élevée comparativement à la vinification classique. Les vins produits selon cette méthode contiennent une quantité d'alcool éthylique plus élevée jusqu'à 0,25 p. 100 pour le cépage *Dimiat* et 0,24 p. 100 pour l'*Ugni blanc*.

b) *Constituants non volatils.*

Parmi les constituants non volatils, nous avons déterminé les sucres, les acides, les matières azotées et les composés phénoliques.

L'absence de différence dans la teneur en sucres des vins vinifiés par les deux méthodes présente une base de comparaison des constituants qui se forment pendant la distillation, objet d'un autre article.

Les différences assez faibles en acide tartrique ont de l'importance uniquement pour la conservation des vins avant la distillation et montrent l'influence des différentes méthodes de vinification sur la précipitation de l'acide tartrique.

La conservation de l'acide malique dans les vins vinifiés selon les deux méthodes confirme le fait que les vins n'ont pas subi de fermentation malo-lactique. Nous n'avons pratiquement pas trouvé de différence en acide malique entre les vins vinifiés en continu et ceux vinifiés selon la méthode classique.

Parmi les constituants non volatils, les matières azotées présentent un intérêt particulier à cause de leur participation aux différentes réactions. Selon MNDJOIAN (1972), les produits de ces réactions jouent un rôle important dans l'arôme et le goût des vins de distillation.

La modification des composés azotés au cours de la fermentation en continu est étudiée par VALOUIKO *et al.* (1962), qui constatent une augmentation d'azote total par rapport au vin témoin, vinifié selon la méthode classique. Les auteurs attribuent cette augmentation en azote à une réduction sensible de consommation d'azote par les levures ainsi qu'à l'autolyse des levures.

NATCHEVA et NILOV (1974), en étudiant l'influence de la méthode sur la qualité des vins de distillation dans les conditions industrielles aboutissent aux mêmes conclusions.

Nos expériences confirment les conclusions citées. Les vins de distillation vinifiés en continu sont plus riches en matières azotées. Cette différence en azote pour les deux cépages est :

— cépage *Dimiat* : de 16 mg/l à 69 mg/l,

— cépage *Ugni blanc* : de 46 à 57 mg/l.

L'influence de la fermentation continue sous pression de CO_2 sur la quantité des composés phénoliques a été déjà étudiée (IVANOV *et al.*, 1971). Les auteurs précités constatent une réduction des matières phénoliques totales lors de la fermentation en continu. Les données de nos essais confirment aussi ces résultats.

c) *Caractéristiques organoleptiques.*

Avant la distillation, les vins ont été dégustés par des dégustateurs entraînés. Les résultats des notes de cette dégustation (tabl. 4) ont été traités par la méthode statistique de répartition normale de grandeur aléatoire. Ces résultats montrent que les vins obtenus par la fermentation continue sous pression de CO_2 sont appréciés pour la production des eaux-de-vie.

Les différences en faveur des vins de la fermentation, d'après des notes moyennes sont sensibles :

— cépage *Dimiat* de 0,10 à 0,40,

— cépage *Ugni blanc* de 0,11 à 0,39.

TABLEAU 4

Résultats des notes de dégustation des vins issus des cépages Dimiat *et* Ugni blanc

	Dimiat					
	Vendange 1971		Vendange 1972		Vendange 1973	
	ferment. classique	ferment. continue	ferment. classique	ferment. continue	ferment. classique	ferment. continue
X_1	7,80	8,15	8,05	8,20	8,05	8,25
X_2	7,80	8,30	7,80	8,00	8,00	8,35
X_3	7,20	7,75	7,00	7,20	7,75	8,40
X_4	7,70	8,00	8,00	7,90	7,50	7,80
X_5	7,55	7,90	8,45	8,65	8,65	8,70
$\overline{X}$	7,61	8,02	7,86	7,99	7,79	8,30
$(X_1 - \overline{X})^2$	0,036	0,017	0,036	0,044	0,004	0,003
$(X_2 - \overline{X})^2$	0,036	0,078	0,004	0,000	0,000	0,003
$(X_3 - \overline{X})^2$	0,168	0,073	0,740	0,624	0,058	0,010
$(X_4 - \overline{X})^2$	0,008	0,000	0,020	0,008	0,240	0,250
$(X_5 - \overline{X})^2$	0,004	0,014	0,348	0,436	0,436	0,160
S^2	0,063	0,046	0,287	0,278	0,185	0,107
A	2,799 > 2,57		0,387 < 2,57		1,283 < 2,57	
	Ugni blanc					
X_1	7,60	8,05	8,20	8,35	8,10	8,30
X_2	7,80	8,25	7,30	7,45	8,15	8,25
X_3	7,60	8,05	7,05	7,00	7,90	8,95
X_4	7,65	8,00	8,00	8,10	7,60	8,00
X_5	7,85	8,05	7,95	8,15	8,65	8,65
$\overline{X}$	7,70	8,08	7,70	7,81	8,08	8,27
$(X_1 - \overline{X})^2$	0,010	0,001	0,250	0,292	0,000	0,001
$(X_2 - \overline{X})^2$	0,010	0,029	0,160	0,130	0,005	0,000
$(X_3 - \overline{X})^2$	0,010	0,001	0,423	0,656	0,032	0,014
$(X_4 - \overline{X})^2$	0,003	0,006	0,090	0,084	0,230	0,073
$(X_5 - \overline{X})^2$	0,023	0,001	0,063	0,116	0,325	0,144
S^2	0,014	0,010	0,247	0,320	0,148	0,058
A	5,484 > 2,57		0,327 < 2,57		0,936 < 2,57	

$\overline{X}$: valeur moyenne,

P : probabilité P = 0,95,

S^2 : dispersion, $S^2 = \dfrac{(X_1 - \overline{X})^2 + \ldots + (X_5 - \overline{X})^2}{4}$

t_A : coefficient de Student, $t_A = 2,57$, $A = \dfrac{(X - \overline{X}^1)^2}{\sqrt{S^2 + S_1^2}} \cdot \sqrt{5}.$

Par contre pour une probabilité de 95 p. 100, le traitement statistique des résultats indique que les vins des cépages *Dimiat* et *Ugni blanc*, vendange 1971, vinifiés par les deux méthodes, se distinguent par leurs caractéristiques organoleptiques et les vins des vendanges 1972, 1973 ne se distinguent pas.

CONCLUSION

L'application de la fermentation continue sous pression de CO_2 nous a amené aux conclusions suivantes :

— La production des vins en continu sous pression de CO_2 réalisée avec une installation bulgare, a permis d'accélérer la vitesse de la fermentation.

— La fermentation continue sous pression de CO_2 permet d'obtenir des vins enrichis en esters, en acides volatils et appauvris en alcools supérieurs et en aldéhydes.

— La fermentation continue sous pression de CO_2 provoque des modifications des différents groupes de constituants non volatils, matières azotées, composés phénoliques, acides.

— La pratique de la fermentation continue sous pression de CO_2 permet l'obtention de vins de qualité, destinés à la fabrication d'eaux-de-vie de vins.

— Il est intéressant de connaître les modifications des différents constituants dans chaque groupe et surtout les alcools supérieurs, les esters et les matières azotées qui feront l'objet d'une publication ultérieure.

Reçu pour publication en août 1976.

RESUMEN

INFLUENCIA DE LA FERMENTACION CONTINUA CON PRESIÓN DE CO_2 SOBRE LA COMPOSICION DE LOS VINOS DESTINADOS A LA DESTILACIÓN

La fermentación del mosto de uva en continuo, con aplicación de presion de CO_2, ha sido realizada durante las vendimias de 1971, 1972 y 1973. Por medio de una instalacion semi-industrial, se ha procedido a la comparacion de la velocidad de fermentacion y la composición de los vinos con aquellas de los vinos producidos por fermentacion discontinua.

En relación con el contenido en componentes volátiles, la fermentación en continuo con aplicación de presión de CO_2, proporciona vinos con destino a la destilación, ricos en ésteres y en ácidos volatiles y pobres en alcoholes superiores y en aldehidos. Esta fermentación modifica también ciertos grupos de componentes no volátiles : materias nitrogenadas, sustancias fenólicas y ácidos.

RIASSUNTO

INFLUENZA DELLA FERMENTAZIONE CONTINUA SOTTO PRESSIONE DI CO_2 SULLA COMPOSIZIONE DEI VINI DESTINATI ALLA DISTILLAZIONE

La fermentazione del mosto d'uva in continuo sotto pressione di CO_2 è stata effettuata durante le vendemmie del 1971, 1972 e 1973. Mediante un impianto semiindustriale, la velocità di fermentazione e la composizione dei vini sono state confrontate con quelle dei vini prodotti mediante fermentazione discontinua.

In rapporto al tenore di constituenti volatili, la fermentazione in continuo, sotto pressione di CO_2, fornisce dei vini destinati alla distillazione, ricchi in esteri e in acidi volatili e poveri in alcooli superiori e in aldeidi. Questa fermentazione modifica ugualmente alcuni gruppi di costituenti non volatili : materie azotate, sostanze fenoliche e acidi.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOJOV I., 1973. *Bases de conduite automatique des processus technologiques.* Édition Technika. Sofia (en bulgare).

CHTORM R., 1970. *Théorie des probabilités, statistique mathématique, contrôle statistique de la qualité.* Édition Mir. Moscou (en russe).

DASKALOV A., GARABEDIAN M., MINKOV P., 1963. *Travaux scientifiques N.J.J.V.P.P.*, tome VI. Sofia. Édition Technika, 81-101 (en bulgare).

FLANZY M., BOUZIGUES L., 1959. Pectines et méthanol dans les moûts de raisin et les vins. *Ann. Technol. agric.*, **1**, 59-67.

FLANZY M., POUX C., DUBOIS P., DUPUY P., 1968. Fermentation du moût de raisin en continu. Formation des alcools supérieurs. *Ann. Technol. agric.*, **17** (3), 207-215.

IVANOV T., PETROV P., VASSILEV Ch., 1971. Installation pour la fermentation des vins blancs en continu. *Avtorsko svidetelstvo*, **15**, 315 (en bulgare).

IVANOV T., 1972. *Technologie des vins.* Plovdiv. Édition Christo, G. Danov, 267-290 (en bulgare).

MALTABAR B., FERTMAN G., 1971. Technologie du Cognac. *Industr. aliment.*, Moscou, 26-32 (en russe).

MNDJOIAN E., 1972. *Transformation des matières azotées lors de la distillation de vins. Bases biochimiques de la production du Cognac.* Édition Naouka, Moscou (en russe).

NILOV V., BOURIAN N., 1967. Bases biochimiques de la fermentation de moût du raisin en continu. *Vignes et vins, Magaratch*, **16** (en russe).

NATCHEVA T., NILOV B., 1974. *Effet du mode de fermentation des vins destinés à la distillation sur les qualités des eaux-de-vie de Cognac.* Édition, Industrie du vin, tome VI, 11-14 (en russe).

TIURINA L. V., 1969. Souches de levures destinées à la fermentation des vins en continu. *Vignes et vins, Magaratch*, **5**, 10-14 (en russe).

VALOUIKO G. G., 1969. *Technologie des vins de table.* Édition Industrie alimentaire, Moscou, 129-132 (en russe).

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (3), 253-271.

CAUSES D'ALTÉRATION DES FARINES DE MIL ET DE SORGH

A. A. THIAM*, R. DRAPRON** et D. RICHARD-MOLARD**
avec la collaboration technique de B. BADILIAN

* *Institut de Technologie alimentaire de Dakar, route des Pères Maristes, Dakar Hann, République du Sénégal,*
** *Station de Biochimie et Physicochimie des Céréales de l'I. N. R. A. au C. E. R. D. I. A., 91305 Massy*

RÉSUMÉ

Dans des conditions expérimentales de stockage voisines de celles généralement réalisées dans les pays tropicaux (température de 30°C, humidité relative de 90-95 p. 100, atmosphère confinée) on observe :

— le développement d'une activité importante d'une partie de la microflore initiale (levures et bactéries, essentiellement) ;

— la consommation concomitante des oses et oligosides alcoolo-solubles et des lipides, en particulier des acides gras libérés par les lipases ;

— l'apparition simultanée d'odeurs et de saveurs caractéristiques de l'altération observée dans la pratique. Parmi les divers composés volatils identifiés, plusieurs constituent les témoins d'une fermentation. Celle-ci se révèle par conséquent comme étant la cause essentielle de l'altération.

En atmosphère semi-confinée, toute autre condition étant égale par ailleurs, l'activité des levures est accompagnée de celle des moisissures et les farines acquièrent alors une odeur typique de moisi.

Lorsque le stockage est réalisé à de plus faibles humidités relatives, le développement des micro-organismes ne se produit pas, aucune oxydation des lipides n'est observée, seule l'activité lipolytique pourrait être la cause d'une altération consécutive à l'acidification des produits.

INTRODUCTION

Céréales tropicales et subtropicales, le mil (*Pennisetum typhoïdes*) et le sorgho (*Sorghum bicolor* L.) MOENCH constituent actuellement la base de l'alimentation d'une partie importante du globe et notamment des régions en voie de développement,

(¹) Travail recouvrant en partie la Thèse de Docteur de 3ᵉ cycle de A. A. THIAM présentée à l'Université Paris-Sud, Centre d'Orsay.

africaines et asiatiques. Au Sénégal, par exemple, la production de sorgho était de 650 000 tonnes en 1974 ; le mil, dont la quantité récoltée n'est pas chiffrée exactement, demeure toutefois la céréale la plus répandue. Le mil sert non seulement à la préparation du couscous, de bouillies et de beignets, mais il entre aussi dans la fabrication du pain (30 p. 100 de mil et 70 p. 100 de blé). Son utilisation, de même que celle du sorgho, est par ailleurs envisagée pour la fabrication de pâtes alimentaires.

Jusqu'à ces derniers temps, en Afrique Noire, ces céréales étaient moulues par la ménagère en fonction des besoins immédiats. Actuellement, l'industrialisation de cette opération se développe en faisant appel, en grande partie, aux procédés de la technologie meunière, le taux d'extraction est de l'ordre de 80 p. 100.

Les farines obtenues présentent l'inconvénient d'avoir une durée de conservation très limitée en raison de l'apparition, souvent rapide, d'odeurs et de saveurs désagréables, généralement jugées comme étant caractéristiques d'un rancissement.

Cette altération a été jusqu'à présent attribuée à l'action d'une lipase provoquant une acidification et à l'oxydation, soit spontanée, soit par l'intermédiaire d'une lipoxygénase, des acides gras libérés. Ainsi, FÉRON et BOUQUET (1948) font état de l'acidification des pâtes de farine de blé contenant de la farine de mil, acidification qu'ils attribuent à l'action d'une lipase. Plus récemment, CARNOVALE et QUAGLIA (1973) observent au cours du stockage d'une farine de mil à 30°C et 95 p. 100 d'humidité relative, un accroissement de l'acidité libre, une variation du rapport entre les lipides polaires et non polaires, ainsi qu'une modification de la composition en acides gras qu'ils attribuent à l'oxydation spontanée des acides palmitique, stéarique, oléique et linolénique. Cependant, le fait que l'acide gras prédominant dans la farine de mil, l'acide linoléique, éminemment oxydable, ne soit pas mis en cause nous conduit à faire certaines réserves sur les conclusions auxquelles aboutissent ces auteurs.

Compte tenu de l'importance économique, technologique et nutritionnelle des problèmes que pose la conservation des farines de mil et de sorgho, nous avons entrepris une étude dans le but d'avoir une connaissance plus précise des phénomènes qui président à l'altération et des différents facteurs qui déterminent leur intensité.

Dans cette étude, l'affinité pour l'eau des farines a reçu une attention toute particulière, d'une part en raison des conditions d'hygrométrie qui règnent en pays tropicaux, d'autre part pour mieux définir les relations susceptibles d'exister entre l'humidité relative et les diverses causes possibles de l'altération.

Les activités de la lipase et de la lipoxygénase ont été mesurées et l'évolution de la lipolyse en fonction de l'activité de l'eau du milieu a été étudiée.

Nous avons également examiné la composition de la flore microbienne ainsi que les modifications de la teneur en divers constituants biochimiques des farines de sorgho et de mil placées dans des conditions de stockage voisines de celles réalisées dans la pratique, soit 30°C et 90-95 p. 100 d'humidité relative, en atmosphère confinée.

Pour comparaison, nous avons étudié la composition de la flore microbienne d'une farine de mil stockée en atmosphère semi-confinée, toute autre condition étant égale par ailleurs.

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des constituants volatils formés dans les farines ainsi stockées a été effectuée, afin de mieux caractériser les phénomènes observés. Une telle analyse doit permettre en outre, en raison de la sensibilité de la technique utilisée, la détection d'un tout début d'altération et par conséquent de prendre toute disposition pour éviter que celle-ci ne se poursuive.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Nous avons utilisé deux échantillons provenant du Centre de Recherches agronomique de Bambey (République du Sénégal), référencés sous les termes : mil « Souna III » ; sorgho, variété *5169*.

L'obtention des farines a été réalisée à l'Institut de technologie alimentaire de Dakar, en adoptant le processus suivant :

— décorticage à sec par élimination des enveloppes par abrasion (taux de décorticage : 20 p. 100 environ) ;

— mouture par percussion à l'aide d'un broyeur à marteaux, suivie d'une séparation par tamisage des résidus d'enveloppes du grain (taux d'extraction de la farine 80 p. 100 environ). La farine passe en totalité à travers un tamis à mailles de 0,5 mm d'ouverture. Les farines ayant une humidité de l'ordre de 12 p. 100 par rapport à la substance sèche sont expédiées par avion et stockées au laboratoire dans des sacs en plastique à 4-5°C.

Méthodes

Dosage de l'amidon.

Le mode opératoire utilisé est celui inspiré de la méthode d'EWERS (1975) décrit dans la norme I.S.O.

Une hydrolyse partielle de la farine est réalisée à 100°C par une solution d'acide chlorhydrique diluée (1, 128 p. 100). Après obtention d'une solution claire, on mesure le pouvoir rotatoire en degrés polarimétriques, la valeur obtenue est multipliée par le coefficient 184,5 utilisé pour les amidons de céréales.

Dosage et caractérisation des glucides alcoolo-solubles.

Le mode opératoire utilisé est celui décrit par CERNING (1970), il consiste à effectuer un traitement à l'éthanol à 80 G. L. à l'ébullition, permettant d'extraire les oses et oligosides dont le degré de polymérisation atteint 10 à 14 unités. Leur dosage est ensuite effectué par la méthode colorimétrique à l'anthrone qui, dans les conditions opératoires décrites par l'auteur, est spécifique des glucides qui forment de l'hydroxyméthylfurfural par action de l'acide sulfurique concentré.

Les différents oses et oligosides présents dans les extraits sont caractérisés par chromatographie sur couche mince de gel de silice, selon la méthode de DE STEFANIS et PONTE (1968) : après développement du chromatogramme, ils sont révélés par la diphénylamine (GIRI et NIGAM, 1959) qui produit des colorations variables suivant leur nature.

Dosage des protéines et des amino-acides.

Protéines.

La teneur en azote total est déterminée par la méthode de KJELDAHL. Pour obtenir la teneur en protéines, la quantité d'azote est multipliée par le coefficient 5,7.

Amino-acides.

Le dosage s'effectue à l'aide d'un appareil automatique « Technicon », après hydrolyse acide (HCl 6 N) des farines pendant vingt-quatre heures à 110°C, en tubes scellés. Dans ces conditions, le tryptophane dégradé au cours de l'hydrolyse n'est pas dosé, celui-ci est déterminé après hydrolyse des farines par l'acide chlorhydrique en présence d'acide formique suivant le mode opératoire décrit par GAITONDE et DOVEY (1970).

Dosage des Lipides, composition en acides gras.

Dosage des lipides totaux.

Le principe de la méthode utilisée (Drapron, 1975) est fondé sur l'hydrolyse ménagée du produit au moyen d'acide chlorhydrique, en présence d'acide formique et d'éthanol. Les complexes lipoprotéiques et glucidiques sont dissociés et du formiate d'éthyle, solvant des lipides, est formé *in situ* sous l'action catalytique des ions H^+. Après extraction liquide-liquide au moyen d'hexane, suivie d'une élimination des solvants par évaporation, les lipides sont dosés par gravimétrie.

Dosage des lipides libres.

L'extraction est réalisée par traitements successifs à l'hexane et à l'oxyde diéthylique à l'aide d'un appareil de Soxhlet modifié pour que l'extraction se fasse à température du laboratoire, la quantité de lipides extraits est déterminée par gravimétrie. L'oxyde diéthylique utilisé au cours des différentes opérations contient un antioxygène, le butylhydroxytoluène (BHT) en solution à 0,01 p. 100, de manière à éviter l'oxydation des acides gras.

Dosage des acides gras des lipides totaux

On effectue une méthanolyse en milieu alcalin des lipides totaux en suivant le mode opératoire décrit par Wolf (1968). Les esters méthyliques d'acides gras sont ensuite séparés, caractérisés et dosés par chromatographie en phase gazeuse en utilisant une colonne en acier inoxydable de 10 pieds de long et de 1/8 de pouce de diamètre, garnie de chromosorb G.A.W. D.M.C.S. imprégné, à raison de 15 p. 100, de succinate de diéthylène glycol.

Le gaz vecteur utilisé est l'azote R à un débit de 25 ml/mn. Les température du four, de l'injecteur et du détecteur sont respectivement : 170°C, 230°C et 250°C.

Dosage des acides gras libres des lipides libres.

Le mode opératoire s'inspire de celui décrit par Drapron et Sclafani (1969) pour la détermination de l'activité lipolytique des produits biologiques solides ou pâteux.

On ajoute aux lipides libres une quantité déterminée d'acide margarique. Les acides gras sont séparés globalement par chromatographie sur couche mince, puis successivement élués, transformés en esters méthyliques et soumis à la chromatographie en phase gazeuse dans les conditions indiquées précédemment, l'acide margarique servant d'étalon interne.

État d'oxydation des lipides.

Nous avons mis en œuvre la méthode de Wolf (1968) fondée sur le fait que les extinctions des extraits lipidiques dans le cyclohexane à 232 nm et à 270 nm, correspondant respectivement aux hydroperoxydes à diènes conjugués et aux dicétones et cétones α-insaturées, sont caractéristiques de l'état d'oxydation.

Affinité pour l'eau des farines, établissement des courbes de sorption.

Nous avons utilisé une méthode dont le principe consiste à laisser réhydrater une série d'échantillons secs, jusqu'à ce qu'ils atteignent leur état d'équilibre, à température constante, avec des tensions de vapeur d'eau déterminées par des solutions aqueuses d'acide sulfurique à diverses concentrations (Drapron et Guilbot, 1962).

Mesure de l'activité lipolytique.

Le principe est fondé sur la détermination, par chromatographie en phase gazeuse, de la quantité d'acides gras libérée au bout d'un temps donné, dans un mélange de produit à examiner et d'huile d'olive placé à température et à humidité relative constantes (Drapron et Sclafani, 1969).

Mesure de l'activité lipoxygénasique.

Le principe de la méthode est fondé sur la mesure, par polarographie, de la diminution de la concentration en oxygène résultant de la formation enzymatique d'hydroperoxydes à partir d'acide linoléique. Les conditions opératoires sont celles décrites par Nicolas et coll. (1974).

Conditions expérimentales du stockage des farines.

L'humidification des farines est réalisée par addition directe de la quantité d'eau nécessaire pour amener leur teneur en eau à la valeur désirée. L'homogénéisation du mélange est effectuée à l'aide d'un mélangeur cubique, tournant autour d'un axe diagonal à raison de 64 tours par minute, pendant trente minutes.

Pour les essais en atmosphère confinée, les farines sont ensuite introduites dans des bocaux stériles, hermétiquement fermés et placés dans une étuve à température choisie.

Pour les essais en atmosphère semi-confinée, la farine est répartie dans des sachets en tissu de polyamide suspendus dans des enceintes cylindriques en verre placées à température constante,

fermées de façon non hermétique, mais dont l'atmosphère est maintenue à une humidité relative de 95 p. 100, déterminée par une solution saturée de sulfate de potassium.

Analyse microbiologique.

Parallèlement au dosage des divers constituants biochimiques et à l'extraction des composés volatils dans les farines initiales et stockées dans différentes conditions, nous avons effectué le dénombrement des micro-organismes par la méthode suivante :

Une partie aliquote de la farine (20 g) est mise en suspension dans 100 cm³ de diluant stérile à pH 7 (chlorure de sodium = 9 g ; peptone pancréatique de caséine = 1 g ; Tween 80 = 0,033 g ; eau distillée en quantité suffisante pour 1 litre).

Le dénombrement des micro-organismes est réalisé à partir de cette suspension par la méthode classique de dilutions-ensemencements, en utilisant des milieux de culture permettant de révéler au mieux les différentes composantes floristiques.

Milieu pour le dénombrement des bactéries aérobies, anaérobies facultatives mésophiles : peptone pancréatique de caséine = 5 g ; extrait de levure = 2,5 g ; glucose = 1 g ; agar-agar = 14 g ; eau distillée sur verre = 1 000 cm³ ; pH 7. Le milieu est stérilisé à 120°C pendant vingt minutes. La durée d'incubation est de soixante-douze heures ± trois heures, à 30°C ± 1°C.

Milieu pour le dénombrement des moisissures et levures : malt = 20 g ; agar-agar = 14 g ; eau distillée sur verre = 500 cm³ ; pH 7,4. Le milieu est stérilisé à 115°C pendant trente minutes. L'incorporation d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) est indispensable pour inhiber le développement des bactéries qui gènerait celui des germes fongiques. La durée d'incubation est de trois jours à 24°C pour les levures et de cinq jours pour les moisissures.

Milieu pour le dénombrement des moisissures osmophiles : malt = 20 g ; chlorure de sodium = 70 g ; saccharose = 50 g ; agar-agar = 14 g ; eau distillée sur verre = 1 000 cm³ ; pH 8. Le milieu est stérilisé à 105°C pendant trente minutes. La durée d'incubation est de douze jours à 30°C.

Analyse des constituants volatils.

La méthode utilisée est celle proposée par Richard-Molard et Drapron (1975) qui fait intervenir une désorption des produits volatils sous vide partiel, suivie de leur condensation et congélation à basse température (— 78°C) par un mélange de glace carbonique et d'éthanol

Les composés ainsi récupérés sont extraits par un solvant organique (CH_2Cl_2), concentrés par évaporation du solvant à basse température, puis séparés par chromatographie en phase gazeuse. Leur identification a été effectuée par spectrométrie de masse et par la comparaison de leur temps de rétention à ceux des corps purs correspondants.

Le chromatographe utilisé est un Girdel, type 75 F D 1, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire en acier de 25 m de long et de 0,5 mm de diamètre intérieur, garnie de Carbowax 20 M, la pression d'entrée est de 0,2 bar et le diviseur est réglé sur 2 p. 100. La température du four est de 80°C et celle de l'injecteur de 110°C.

Le spectromètre de masse est un appareil Varian Mat, type C H 5 dont l'intensité du flux est de 300 μA et la température de la source est de 300°C, l'énergie d'ionisation étant de 70 *e*V.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Affinité pour l'eau des farines

Les courbes de sorption à 30°C des farines de mil et de sorgho sont pratiquement superposées et présentent une allure classique avec une partie linéaire qui fait apparaître l'eau solvante pour une humidité relative de l'ordre de 72 p. 100 (fig. 1).

Ces courbes n'ont pas pu être prolongées au-delà d'une humidité relative de 88 p. 100 en raison d'un développement de micro-organismes très important, des moisissures en particulier.

Activités enzymatiques

Activité lipolytique, à 30°C, en fonction de l'activité de l'eau.

L'activité lipolytique n'a pu être suivie qu'aux humidités relatives comprises entre 30 et 85 p. 100 (fig. 2). La trop petite quantité d'acides gras libérée aux plus

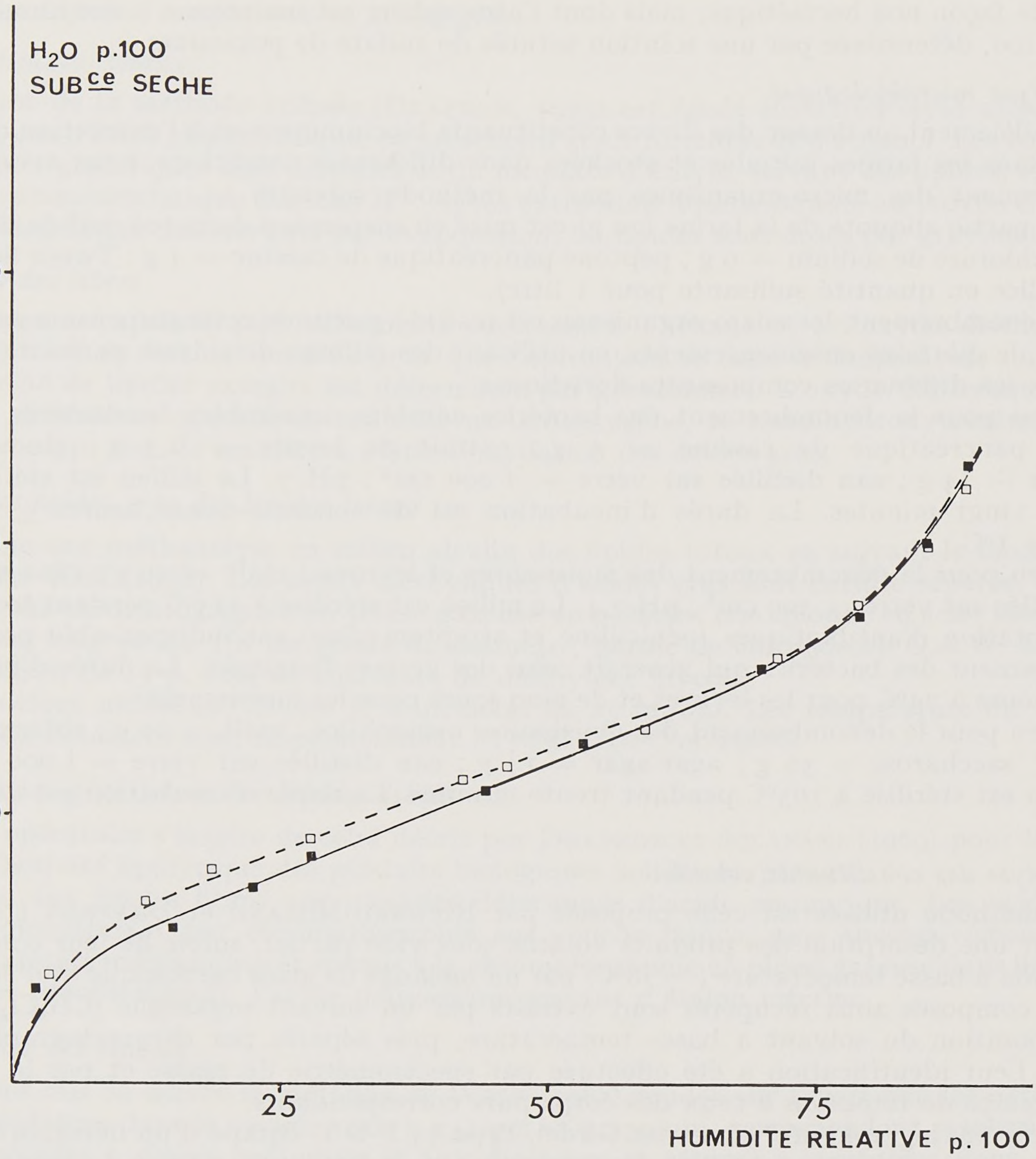


FIG. 1. — *Isothermes de sorption, à 30°C, des farines de mil (■) et de sorgho (□)*

faibles humidités relatives et le développement des micro-organismes au-delà de 85 p. 100 conduisent à une trop grande dispersion des résultats pour que ceux-ci puissent être pris en considération.

Quoi qu'il en soit, on constate que la lipolyse est d'autant plus importante que l'hydratation est élevée et qu'elle intervient bien avant l'apparition d'eau solvante, confirmant ainsi les observations de ACKER et BEUTLER (1965), de CAILLAT et DRAPRON (1974) à partir de milieux modèles, semi-synthétiques.

L'évolution de l'activité lipasique est sensiblement identique pour le mil et le sorgho. Elle est environ cinq fois supérieure à celle des farines de blé et à peu près du même ordre de grandeur que celle du son de blé. L'acidité qui en résulte (de l'ordre de 6 mg d'acide oléique par g de farine, au bout de soixante-douze heures à 30°C et 85 p. 100 d'humidité relative) peut donc être considérée comme une altération, mais dont l'effet se limite à la seule saveur des farines.

Activité lipoxygénasique.

Les valeurs d'activité obtenues aux pH 7 et 9 sont nulles pour la farine de sorgho et très faibles pour celle de mil, soit 0,20 unité lipoxygénasique par gramme

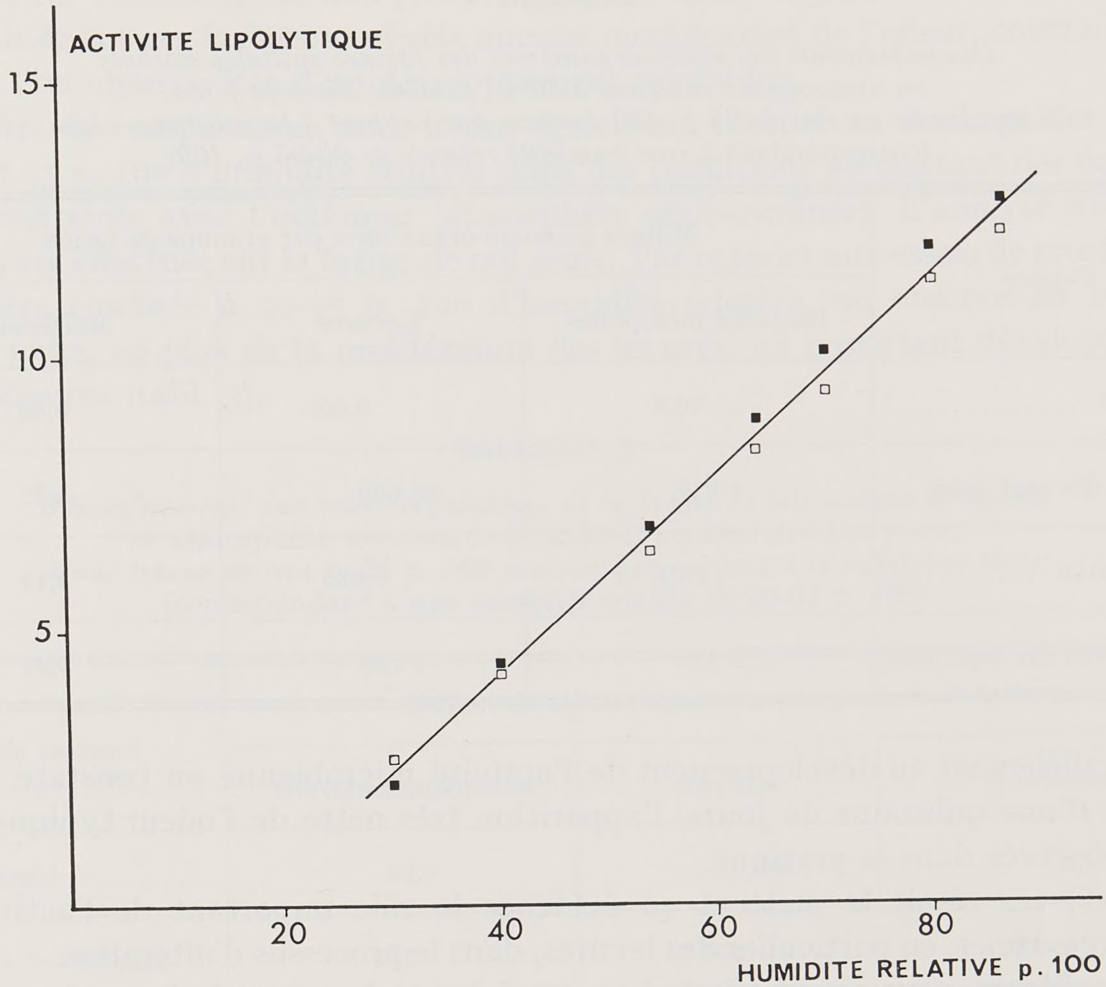


FIG. 2. — *Activité lipolytique*
(exprimée en mg d'acide oléique libéré en 72 h, à 30°C, par 2 g de produit)
des farines de mil (■) *et de sorgho* (□), *en fonction de l'humidité relative*

(U.L.P.X./g). Une unité lipoxygénasique correspond à la quantité d'enzyme qui provoque l'oxydation d'une micromole de linoléate par minute, à 25°C.

A titre de comparaison, l'activité lipoxygénasique d'une farine de blé est à peu près 20 fois plus importante que celle de la farine de mil et celle de la farine de fève est environ 1 000 fois plus élevée.

Ainsi, un rancissement oxydatif par l'intermédiaire de la lipoxygénase ne peut être tenu comme responsable de l'altération des farines de mil et de sorgho.

Évolution de l'activité microbienne à 30°C dans différentes conditions d'humidité relative, en atmosphères confinées et semi-confinées

Afin de se placer dans des conditions voisines de celles réalisées dans la pratique, nous avons stocké les farines de mil et de sorgho en atmosphère confinée, à une température de 30°C et à une humidité relative de 90-95 p. 100.

Dans ces conditions, on observe un développement microbien important, le nombre des bactéries et surtout des levures s'étant accru considérablement ; par contre, les moisissures, plus exigeantes en oxygène, restent pratiquement stables (tabl. 1).

TABLEAU I

Dénombrements des micro-organismes des farines initiales stockées en atmosphère confinée *à 30°C, pendant dix-sept jours, à une teneur en eau de 25 p. 100 environ par rapport à la substance sèche* (correspondant à une *humidité relative de 90-95 p. 100*)

Farines	Milliers de micro-organismes par gramme de farine		
	Bactéries mésophiles	Levures	Moisissures
Mil initial	46,8	0,005	0,60
Mil après dix-sept jours	1 920	90 000	0,72
Sorgho initial	28,8	0,005	0,18
Sorgho après dix-sept jours	2 280	7 200	0,24

Parallèlement au développement de l'activité microbienne on constate, surtout au bout d'une quinzaine de jours, l'apparition très nette de l'odeur typique d'altération observée dans la pratique.

Ainsi, ces résultats mettent en évidence le rôle important de l'activité des micro-organismes, en particulier des levures, dans le processus d'altération.

Par ailleurs, nous avons effectué un essai de stockage en abaissant la teneur en eau à 18 p. 100 par rapport à la substance sèche (toute autre condition étant égale à celle de l'essai précédent). Cette teneur en eau, correspondant à une humidité relative de 80 p. 100, ne permet ni le développement des bactéries, ni celui des levures non osmophiles, en outre la tension d'oxygène est trop faible pour que les moisissures puissent se multiplier (tabl. 2).

TABLEAU 2

Dénombrements des micro-organismes des farines initiales et stockées en atmosphère confinée *à 30°C pendant dix-sept jours, à une teneur en eau de 18 p. 100 par rapport à la substance sèche* (correspondant à une *humidité relative de 80 p. 100*)

Farines	Milliers de micro-organismes par gramme de farine		
	Bactéries mésophiles	Levures	Moisissures
Mil initial	185	0,005	0,110
Mil stocké dix-sept jours	22	0,005	0,09
Sorgho initial	215	0,005	0,195
Sorgho stocké dix-sept jours	3,5	0,1	0,335

Dans ces conditions de non prolifération des micro-organismes, l'analyse sensorielle réalisée sur ces farines ne révèle aucune modification de l'odeur, contrairement à ce que l'on observe lors d'un développement microbien.

A titre de comparaison, nous avons également effectué un stockage des farines à 30°C et 95 p. 100 d'humidité relative dans des conditions permettant des échanges gazeux restreints avec l'extérieur (atmosphère semi-confinée). L'analyse microbiologique a été effectuée sur la farine de mil seule. Par rapport aux essais de stockage en atmosphère confinée à 90-95 p. 100 d'humidité relative, on observe au bout de dix-sept jours, en plus de la prolifération des levures, un important développement des moisissures (tabl. 3).

TABLEAU 3

Dénombrements des micro-organismes de la farine de mil initiale et stockée en atmosphère semi-confinée, *à 30°C pendant dix-sept jours, à une teneur en eau de 25 p. 100 environ par rapport à la substance sèche* (correspondant à une *humidité relative de 90-95 p. 100*)

Durée en jours		Milliers de micro-organismes par gramme de farine		
		Bactéries mésophiles	Levures	Moisissures
Mil	Initial	92,5	0,005	0,16
	Après 17 jours	145	47 400	32 000

On constate en outre que les deux farines présentent des caractères olfactifs identiques, mais très différents de ceux observés dans le cas du stockage en atmosphère confinée à 90-95 p. 100 d'humidité relative, l'odeur perçue étant caractéristique de moisi.

Évolution des constituants biochimiques des farines stockées en atmosphère confinée, à 30°C et 90-95 p. 100 d'humidité relative

Les résultats, consignés dans les tableaux 4 et 5, montrent que les seuls constituants dégradés sont les glucides alcoolo-solubles et les lipides, les teneurs en amidon, en protéines et amino-acides restant constantes.

La chromatographie sur couche mince de la fraction glucidique alcoolo-soluble montre que les oses et oligosides présents dans les farines initiales sont dégradés en quasi totalité, seule une petite quantité de glucose (provenant probablement de l'hydrolyse enzymatique de l'amidon) est mise en évidence.

En ce qui concerne les lipides totaux (fig. 3), on observe une diminution qui atteint 75 p. 100 environ, l'évolution des lipides libres étant sensiblement la même.

Afin de préciser le phénomène, nous avons suivi, en fonction du temps de stockage, l'évolution de la teneur des différents acides gras libres des deux farines considérées (fig. 4). On observe tout d'abord une augmentation suivie d'une diminution, le maximum étant atteint au 7^{e} jour environ. Par ailleurs, les variations observées ont généralement une amplitude plus grande dans le cas du mil que dans celui du sorgho, exception faite de l'acide oléique.

TABLEAU 4

Composition, p. 100 de la substance sèche, en divers constituants biochimiques des farines initiales et stockées en atmosphère confinée, *à 30°*C *pendant dix-sept jours, à une teneur en eau de 25 p. 100 environ par rapport à la substance sèche* (correspondant à une *humidité relative de 90-95 p. 100*)

Constituants	Farine de mil		Farine de sorgho	
	Initiale	Stockée 17 jours	Initiale	Stockée 17 jours
Amidon	73,5	73,8	76,2	76,5
Glucides alcoolo-solubles	1,78	0,36	1,34	0,75
Protéines...............	10,87	11	9,88	9,93
Lipides totaux	5,84	1,28	4,34	1,10
Lipides libres	5,28	0,77	4,07	1,14

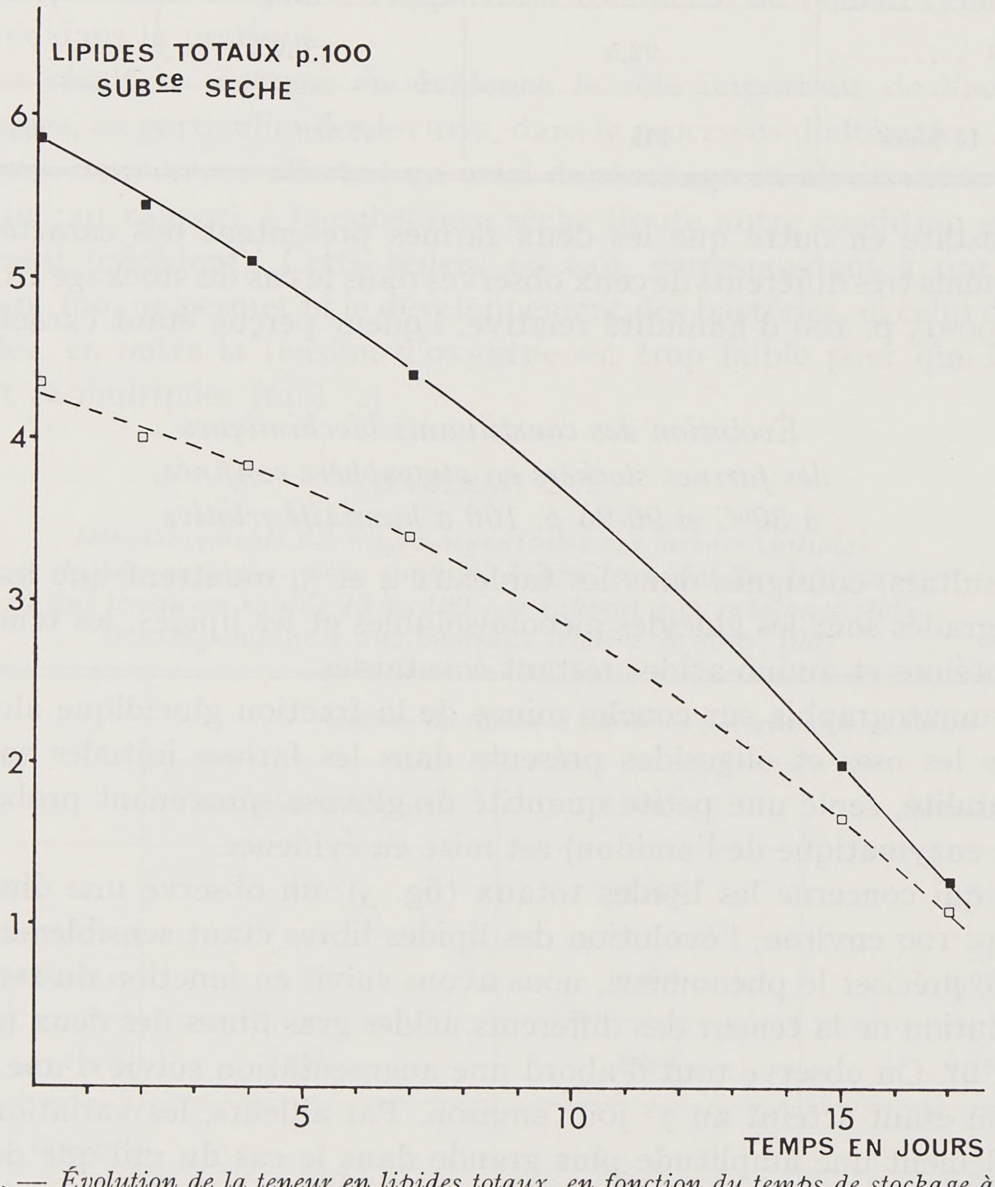


FIG. 3. — *Évolution de la teneur en lipides totaux, en fonction du temps de stockage à 30°*C, *90-95 p. 100 d'humidité relative, en atmosphère confinée.* (■) *farine de mil,* (□) *farine de sorgho*

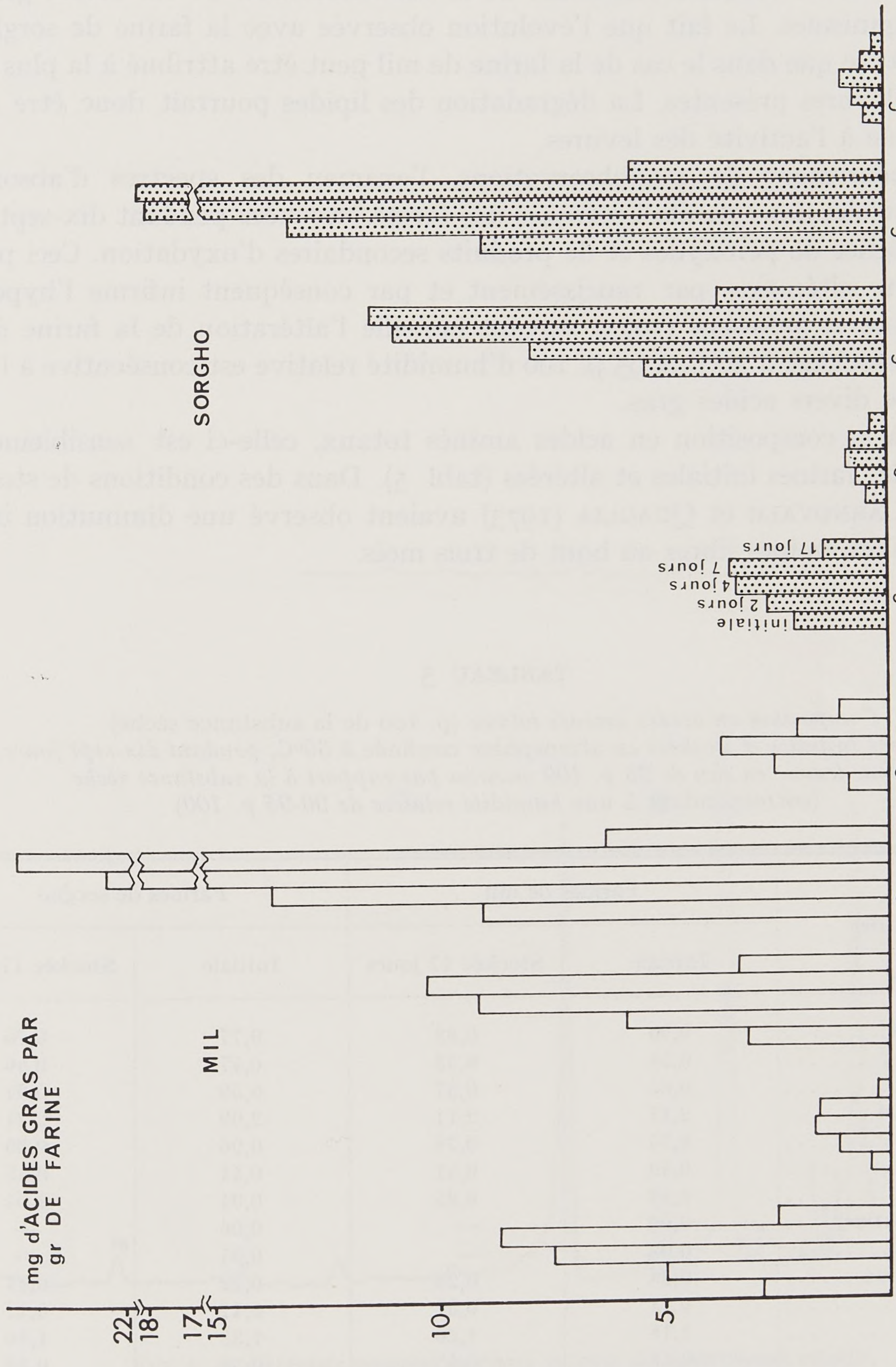


FIG. 4. — *Évolution de la teneur en acides gras libres, en fonction du temps de stockage à 30°C, 90-95 p. 100 d'humidité relative, en atmosphère confinée.* (□) *farine de mil* (▩) *farine de sorgho*

L'augmentation observée au début du stockage peut s'expliquer par l'action des lipases du grain et des micro-organismes ; d'ailleurs nous avions déjà constaté une activité lipolytique anormalement grande aux humidités relatives élevées, due à un développement microbien, ce qui ne nous avait pas permis de déterminer l'activité de la lipase propre aux farines considérées (fig. 2). La diminution qui se produit ensuite résulte vraisemblablement de la consommation de ces acides gras par les micro-organismes. Le fait que l'évolution observée avec la farine de sorgho est moins accentuée que dans le cas de la farine de mil peut être attribué à la plus faible quantité de levures présentes. La dégradation des lipides pourrait donc être essentiellement due à l'activité des levures.

Indépendamment de ces observations, l'examen des spectres d'absorption dans l'ultra-violet des extraits lipidiques des farines stockées pendant dix-sept jours indique l'absence de peroxydes et de produits secondaires d'oxydation. Ceci permet d'exclure une altération par rancissement et par conséquent infirme l'hypothèse de CARNOVALE et QUAGLIA (1973) suivant laquelle l'altération de la farine de mil au cours du stockage à 30°C et 95 p. 100 d'humidité relative est consécutive à l'auto-oxydation de divers acides gras.

Quant à la composition en acides aminés totaux, celle-ci est sensiblement la même dans les farines initiales et altérées (tabl. 5). Dans des conditions de stockage identiques, CARNOVALE et QUAGLIA (1973) avaient observé une diminution importante des acides aminés libres au bout de trois mois.

TABLEAU 5

Compositon en acides aminés totaux (p. 100 de la substance sèche) *des farines initiales et stockées en* atmosphère confinée *à 30°C, pendant dix-sept jours, à une teneur en eau de 25 p. 100 environ par rapport à la substance sèche* (correspondant à une *humidité relative de 90-95 p. 100*)

Amino-acides	Farines de mil		Farines de sorgho	
	Initiale	Stockée 17 jours	Initiale	Stockée 17 jours
Acide aspartique	0,95	0,88	0,77	0,76
Thréonine	0,54	0,53	0,47	0,46
Sérine	0,65	0,57	0,59	0,61
Acide glutamique	2,17	2,11	2,09	2,21
Proline	0,74	0,79	0,96	0,99
Glycine	0,40	0,41	0,41	0,45
Alanine	0,88	0,84	0,94	1,04
Cystéine (1/2 cystine)	0,09	—	0,06	—
Méthionine	0,08	—	0,04	—
Méthionine sulfone	0,28	0,29	0,22	0,25
Isoleucine	0,51	0,51	0,42	0,42
Leucine	1,18	1,20	1,33	1,40
Tyrosine	0,44	0,45	0,35	0,39
Tryptophane	0,34	0,32	0,19	0,19
Phénylalanine	0,62	0,64	0,63	0,61
Lysine	0,38	0,40	0,40	0,35
Histidine	0,33	0,34	0,41	0,37
Arginine	0,62	0,61	0,48	0,52

Évolution des constituants volatils.

Les figures 5 et 6 représentent les chromatogrammes en phase gazeuse des farines initiales et stockées pendant dix-sept jours en atmosphère confinée, à 30°C et 90-95 p. 100 d'humidité relative.

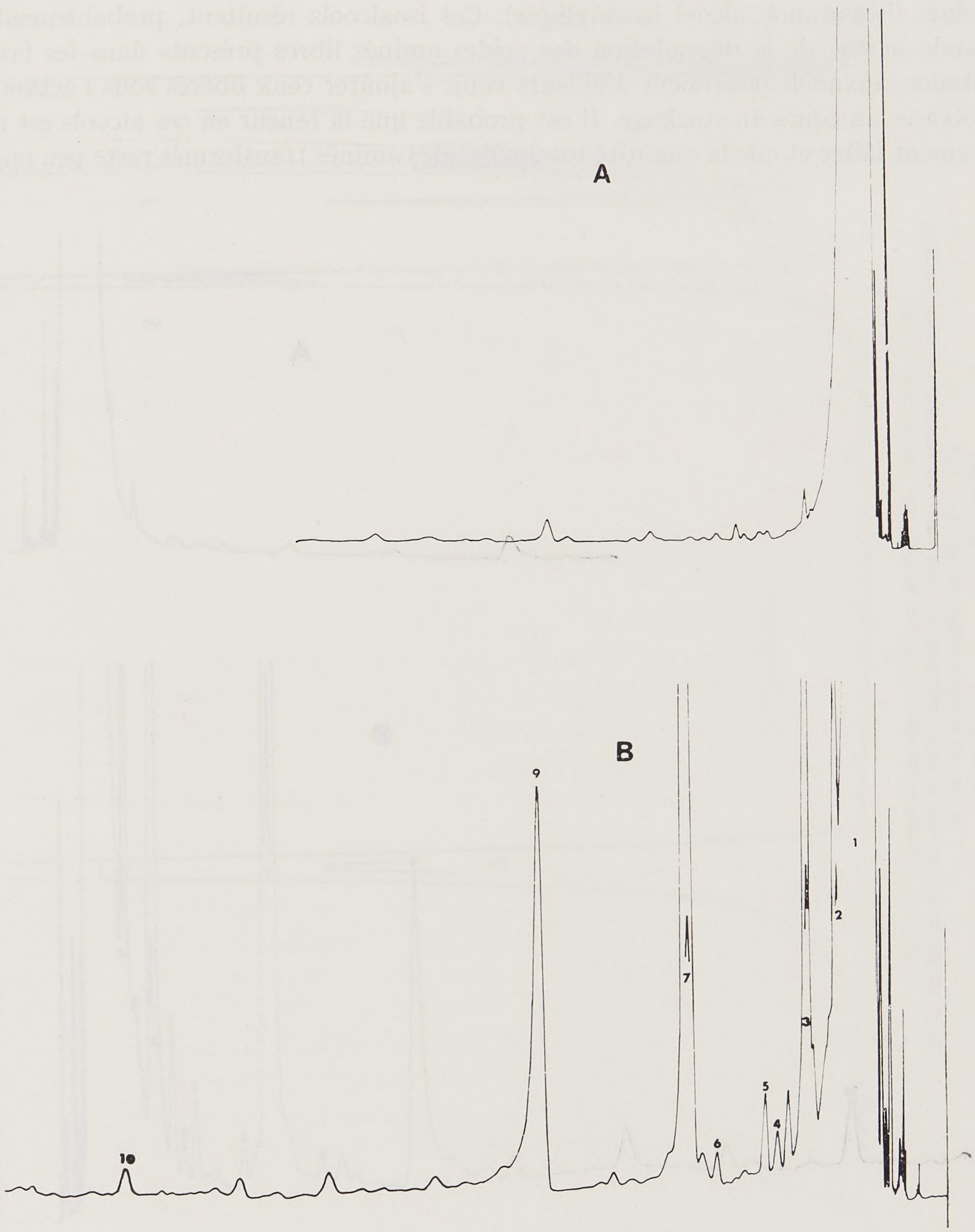


FIG. 5. — *Chromatogrammes en phase gazeuse des constituants volatils des farines de mil initiale* (A) *et stockée à 30°C pendant dix-sept jours, en atmosphère confinée, à une humidité relative de 90-95 p. 100* (B)

1 : solvant d'extraction
2 : *n*-propanol
3 : isobutanol
4 : acétate d'isoamyle
5 : *n*-butanol
6 : méthyl-pentyl-cétone
7 : alcool isoamylique
9 : acétoïne
10 : octanoate d'éthyle

Quatre alcools, quatre esters, une cétone et une cétone-alcool, ont pu être caractérisés par spectrométrie de masse, les constituants majoritaires étant l'alcool isoamylique, l'éthanol (identifié dans l'espace de tête), l'isobutanol et l'acétoïne. Tous ces constituants peuvent être considérés comme le résultat d'une fermentation, soit des hexoses (*n*-propanol, *n*-butanol, isobutanol et acétoïne), soit des acides aminés (isobutanol, alcool isoamylique). Ces isoalcools résultent, probablement en grande partie, de la dégradation des acides aminés libres présents dans les farines initiales, auxquels pourraient d'ailleurs venir s'ajouter ceux libérés sous l'action des protéases au cours du stockage. Il est probable que la teneur en ces alcools est relativement faible et que la quantité totale d'acides aminés transformés reste peu impor-

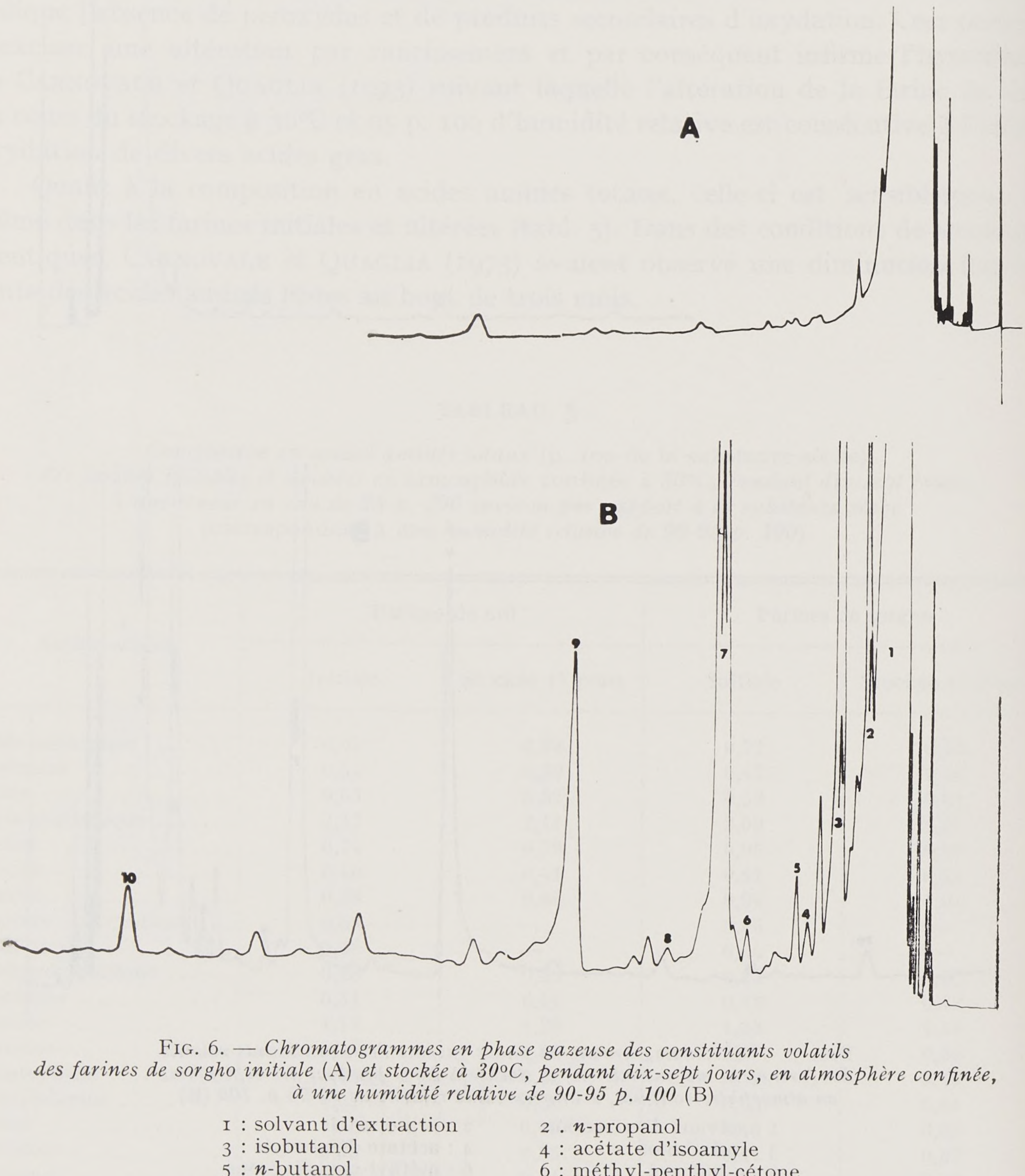


Fig. 6. — *Chromatogrammes en phase gazeuse des constituants volatils des farines de sorgho initiale* (A) *et stockée à 30°C, pendant dix-sept jours, en atmosphère confinée, à une humidité relative de 90-95 p. 100* (B)

1 : solvant d'extraction
2 . *n*-propanol
3 : isobutanol
4 : acétate d'isoamyle
5 : *n*-butanol
6 : méthyl-penthyl-cétone
7 : alcool isoamylique
8 : hexanoate d'éthyle
9 : acétoïne
10 : octanoate d'éthyle

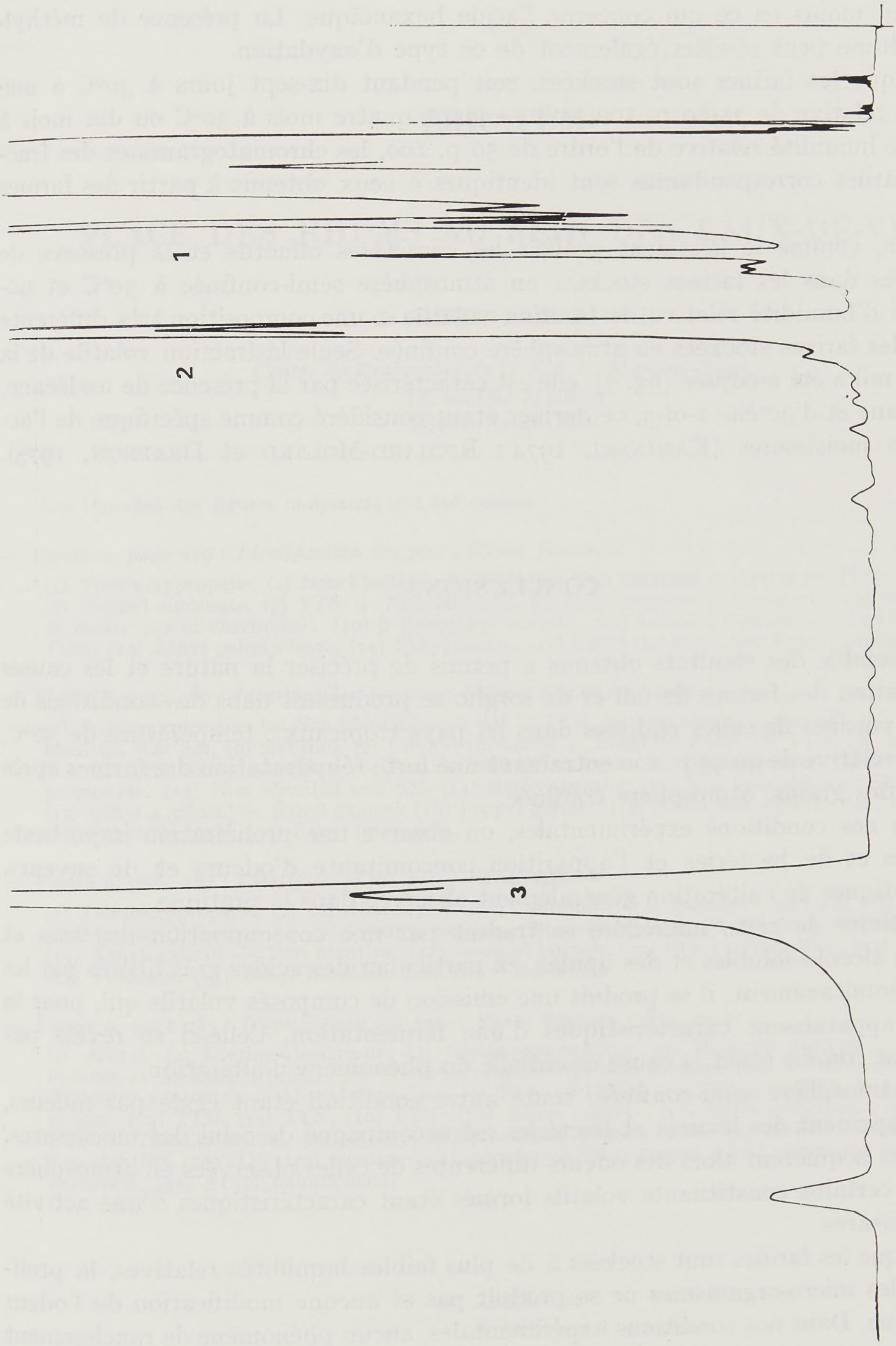


FIG. 7. — *Chromatogrammes en phase gazeuse des constituants volatils de la farine de mil stockée à 30°C, pendant dix-sept jours en atmosphère semi-confinée à une humidité relative de 90-95 p. 100*

1 : undécane 2 : dodécane

3 : octène 1-ol-3

tante et à la limite de la sensibilité de la méthode de dosage de ces derniers. Quant à l'hexanoate et à l'octanoate d'éthyle, ceux-ci sont probablement issus des acides hexanoïque et octanoïque provenant de la dégradation des acides gras par β-oxydation, au moins en ce qui concerne l'acide hexanoïque. La présence de méthyl-pentyl cétone peut résulter également de ce type d'oxydation.

Lorsque les farines sont stockées, soit pendant dix-sept jours à 30°C à une humidité relative de 75-80 p. 100, soit pendant quatre mois à 30°C ou dix mois à 5°C à une humidité relative de l'ordre de 50 p. 100, les chromatogrammes des fractions volatiles correspondantes sont identiques à ceux obtenus à partir des farines initiales.

Enfin, comme le laissaient prévoir les caractères olfactifs et la présence de moisissures dans les farines stockées en atmosphère semi-confinée à 30°C et 90-95 p. 100 d'humidité relative, la fraction volatile a une composition très différente de celle des farines stockées en atmosphère confinée. Seule la fraction volatile de la farine de mil a été analysée (fig. 7), elle est caractérisée par la présence de undécane, de dodécane et d'octène 1-ol-3, ce dernier étant considéré comme spécifique de l'activité des moisissures (KAMINSKI, 1974 ; RICHARD-MOLARD et DRAPRON, 1975).

CONCLUSIONS

L'ensemble des résultats obtenus a permis de préciser la nature et les causes de l'altération des farines de mil et de sorgho se produisant dans des conditions de stockage voisines de celles réalisées dans les pays tropicaux : température de 30°C, humidité relative de 90-95 p. 100 entraînant une forte réhydratation des farines après mouture des grains, atmosphère confinée.

Dans nos conditions expérimentales, on observe une prolifération importante de levures et de bactéries et l'apparition concomitante d'odeurs et de saveurs, caractéristiques de l'altération généralement observée dans la pratique.

L'activité de cette microflore se traduit par une consommation des oses et oligosides alcoolo-solubles et des lipides, en particulier des acides gras libérés par les lipases. Simultanément, il se produit une émission de composés volatils qui, pour la plupart, apparaissent caractéristiques d'une fermentation. Celle-ci se révèle par conséquent comme étant la cause essentielle du phénomène d'altération.

En atmosphère semi-confinée, toute autre condition étant égale par ailleurs, le développement des levures et bactéries est accompagné de celui des moisissures. Les farines acquièrent alors des odeurs différentes de celles observées en atmosphère confinée, certains constituants volatils formés étant caractéristiques d'une activité des moisissures.

Lorsque les farines sont stockées à de plus faibles humidités relatives, la prolifération des micro-organismes ne se produit pas et aucune modification de l'odeur n'est perçue. Dans nos conditions expérimentales, aucun phénomène de rancissement des lipides par oxydation spontanée ou par l'intermédiaire d'une lipoxygénase n'a été observé. Seule, l'activité lipolytique pourrait alors être la cause d'une altération ne portant d'ailleurs que sur la saveur des produits.

Ann. Technol. agric., 1975, **24** (3-4), 269-286.

ERRATUM

PLACE DES RHUMS AU SEIN DES EAUX-DE-VIE

P. de SMEDT et P. LIDDLE

Centre de Recherches de la S.A.F. Martini-Rossi,
19, avenue Michelet
93404 Saint-Ouen

Les légendes des figures ci-dessous ont été omises :

— Figure 4, page 279 : *Identification des pics* : *Rhum Jamaïque*

(1) Triéthoxypropane. (2) Non identifié. (3) TTN. (4) Non identifié + Traces de TTN. (5) Menthol (6) Diéthyl succinate. (7) TTN + Non identifié. (8) Sesquiterpène de masse 204. (9) Sesquiterpène de masse 202 ar-curcumène. (10) β-Phénéthyl acétate. (11) Isoamyl caprate + Non identifié. (12). TDN. (13) Éthyl palmitoleate. (14) Éthyl oleate. (15) Éthyl linoleate. (16) Éthyl linolenate.

— Figure 6, page 280 : *Identification des pics* : *Rhum « Grand fond galion »*

(1) Triéthoxypropane. (2) Non identifié, voir SM + TTN. (3) Non identifié, voir SM + TTN. (4) Non identifié, voir SM. (6) Menthol. (7) Diéthyl succinate + Éthyl benzoate. (8) TTN. (9) Non identifié, voir SM. (10) Méthyl salicylate + Non identifié (M = 158). (11) Damascénone. (12) Éthyl phényl-3 propionate. (13) Non identifié voir SM. (14) Méthyl gaïacol. (15) Non identifié, voir SM. (16) TDN. (17) Éthyl 4 gaïacol + Éthyl gaïacol. (18) Propyl gaïacol. (19) Éthyl palmitoléate. (20) Éthyl oleate. (21) Éthyl linoléate. (22) Éthyl linolenate.

— Figure 8, page 282 : *Identification des pics* : *Rhum agricole*

(1) Triéthoxypropane. (2) Menthol. (3) Diéthyl succinate. (4) Isoamyl caprylate. (5) β-Phénétyl acetate. (6) Damascenone. (7) Isoamyl caprate. (8) β-Phényléthanol. (9) Non identifié + TDN. (10) Éthyl gaïacol + Non identifié. (11) Isoamyl laurate. (12) Éthyl palmitoléate. (13) Éthyloleate. (14) Phtalate. (15) Éthyl linoléate. (16) Éthyl linolénate.

— Figure 9, page 283 : *Identification des pics* : *Rhum Réunion « Bois rouge »*

(1) Acétal. (2) Diéthoxyisobutane. (3) Diéthoxyisopentane. (4) Méthyl-2 butanol-1 + Méthyl-3 butanol-1. (5) Ethylcaproate. (6) Triéthoxypropane. (7) Non identifié (spectre de masse très voisin de l'éthyl-3 furoate). (8) Éthyl caprylate. (9) TTN. (10) TTN. (11) TTN. (12) TTN. (13) Éthyl pelargonate. (14) TTN. (15) TTN. (16) TTN. (17) Éthyl caprate. (18) Méthoxystyrène. (19) TTN. (20) TTN + TDN (possible). (21) Méthyl salicylate. (22) Damascénone. (23) Éthyl Laurate. (24 à 27) Non identifié. (28) TDN. (29) Isomère de l'eugénol. (30) Éthyl gaïacol. (31) Éthyl myristate. (32) Éthyl palmitate. (33) Éthyl palmitoléate.

Ces conclusions permettent d'envisager le contrôle et la prévention des altérations. Ainsi, comme l'ont déjà proposé RICHARD-MOLARD et DRAPRON (1975) dans le cas de maïs, le contrôle de l'état de conservation des lots de farines peut être effectué par l'analyse de la fraction volatile par chromatographie en phase gazeuse. De plus, l'évolution d'un des constituants, l'alcool isoamylique ou l'acétoïne par exemple, pourrait servir en quelque sorte de signal d'alarme.

L'un des moyens de prévention de l'altération que l'on peut préconiser est le maintien d'une teneur en eau des farines à une valeur inférieure à celle correspondant au seuil de développement des micro-organismes, soit 11 à 12 p. 100 pour une température de l'ordre de 30°C. Le stockage en enceintes étanches peut donc s'envisager, sous réserve cependant qu'il puisse s'effectuer en se mettant à l'abri des variations brusques de températures. De telles variations peuvent en effet provoquer des migrations ou même des condensations de la vapeur d'eau au niveau des parois des cellules de stockage, entraînant ainsi le développement de l'activité microbienne. Le stockage en atmosphère libre paraît difficilement envisageable par suite du risque de réhydratation des farines et du développement rapide des moisissures, ce dernier se produisant en outre à un seuil d'hydratation plus faible que celui observé pour les levures et bactéries.

En dernier ressort, le traitement thermique des farines (vapeur d'eau surchauffée ou séchage à haute température) peut être utilisé en vue de détruire les germes microbiens, à la condition cependant que celui-ci ne soit pas préjudiciable à la qualité technologique et nutritionnelle. Un tel procédé a déjà été proposé par la F.A.O. (1971) pour inactiver les lipases. Il conviendrait, à la suite de ce traitement, de prendre toute précaution pour éviter une recontamination ultérieure des stocks.

Reçu pour publication en septembre 1976.

REMERCIEMENTS

Nous remercions P. DUBOIS et J. RIGAUD, de la Station de Technologie des produits végétaux de l'I.N.R.A., à Dijon, pour la détermination des spectres de masse.

SUMMARY

CAUSES OF DETERIORATION IN STORED FLOURS OF MILLET AND SORGHUM

Flours of millet and sorghum are experimentally airtight stored under conditions reproducing the climatic characteristics of tropical areas. (Temperature 30°C, Relative Humidity 90-95 p. 100).

Under such conditions, microbiological and biochemical changes are observed :

A part of the microflora — mainly yeasts and bacteria — are actively growing.

Sugars, alcohol-soluble carbohydrates and lipids —especially the free fatty acids produced by lipolysis — are decreasing.

In the same time, the stored flours exhibit a strong off-flavour that is characteristic of the deterioration commonly observed in the practice.

The numerous volatile compounds responsible for this off-flavour have been identified ; they indicate that a fermentation occurs in the stored products.

It may be concluded, therefore, that microbial fermentations play the major role in the deterioration process.

When flours are stored under semi-aerobic conditions (Temperature 30°C, Relative Humidity 90-95 p. 100), a musty off-flavour can be detected, while storage fungi grow.

In flours with lower moisture contents, micro-organisms do not grow and off-flavours do not eppear ; oxidation of lipids cannot be detected and only a lipolytic activity may occur and lead to a loss of quality by acidification.

RESUMEN

CAUSAS DE ALTERACION DE LAS HARINAS DE MIJO Y DE SORGO

En condiciones experimentales de almacenamiento semejantes a las que existen generalmente en los países tropicales (temperatura de 30°C, humedad relativa de 90-95 %, atmósfera confinada), se puede observar :

— el desarrollo de una actividad importante de una parte de la microflora inicial (principalmente, levaduras y bacterias);

— el consumo concomitantes de las osas (azúcares simples y no hidrolizables) y oligosidas alcohosolubles y de los lípidos, y en particular de los ácidos grasos liberado por las lipasas;

— la aparición simultanea de olores y sabores caracteristicos de la alteración observada en la práctica. Entre los diversos volátiles identificados, algunos de los mismos constituyen los testigos de una fermentación. Esta se pone de manifiesto como causa primordial de la alteración.

En atmósfera semiconfinada, y siempre con equivalencia de condiciones, la actividad de las levaduras queda acompanada por aquella correspondientes a los mohos y las harinas toman así un olor típico de enmohecimiento o de humedad.

Cuando el almacenamiento tiene lugar con humedades más reducidas relativas, no se produce ningún desarrollo de los microorganismos, ni tampoco se observa oxidación alguna de los lípidos. Unicamente la actividad lipolítica podría ser causa de una alteración consecutiva a la acidificación de los productos.

RIASSUNTO

CAUSE D'ALTERAZIONE DELLA FARINA DI MIGLIO E DI SORGO

Nelle condizioni sperimentali di stoccaggio vicine a quelle generalmente realizzate nei paes tropicali (temperatura di 30°C, umidità relativa di 90-95 %, atmosfera chiusa), si osserva :

— lo sviluppo di una intensa attività du ina parte della microflora iniziale (principalmente lieviti e batteri) ;

— il consumo concomitante degli osii e oligosidi solubili in alcool e dei lipidi, in particolare degli acidi grassi liberati dalle lipasi ;

— l'apparizione simultanea di odori e di sapori caratteristici dell'alterazione osservata praticamente. Tra i diversi componenti volatili identificati, parecchi sono rivelatori di una fermentazione. Quest'ultima sembra sia dunque la causa essenziale dell'alterazione.

In atmosfera semichiusa e mantenendo d'altra parte le altre condizioni, all'attività dei lieviti si aggiunge quella delle muffe e le farine emano allora un tipico odore d'ammuffito.

Quando lo stoccaggio avviene con dei valori di umidità relativa più bassi di quelli sopraccitati, non si ha sviluppo di microorganismi e non si osserva alcuna ossidazione dei lipidi; solo l'attività lipolitica potrebbe essere la causa du ina alterazione consecutiva all'acidificazione dei prodotti.

ZUSAMMENFASSUNG

URSACHEN DER VERÄNDERUNG VON SORGHUM-UND HIRSEMEHLEN

Unter experimentellen Lagerungsbedingungen, die im allgemeinen den Verhältnissen tropischer Länder entsprechen (Temperatur von 30°C, 90-95 p. 100 relative Luftfeuchtigkeit, geschlossene Atmosphäre) wird folgendes beobachtet :

Bedeutende Aktivitätszunahme der ursprünglichen Mikroflora (hauptsächlich Hefen und Bakterien).

Gleichzeitiger Verbrauch der alkohollöslichen Zucker und der Lipide, insbesondere der durch Lipase freigesetzten Fettsäuren.

Gleichzeitiges Entstehen von Geruch und Geschmack, was in der Praxis als charakteristisch für eine Veränderung angesehen wird, Entstehen vieler flüchtiger Bestandteile, die ein Beweis für eine Fermentation sind.

Demnach ist die Fermentation als die hauptsächliche Ursache einer Veränderung anzusehen.

In halbgeschlossener Atmosphäre bei sonst gleichbleibenden Lagerungsbedingungen,bildet sich neben den Hefen Schimmel, und die Mehle bekommen einen typischen schimmeligen Geschmack.

Im Verlaufe einer Lagerung bei niedrigeren relativen Luftfeuchtigkeiten bilden sich keine Mikroorganismen, es wird auch keine Fettoxidation beobachtet. Es wird in diesem Fall vermutet, dass allein die lipolytische Aktivität, die eine Säurebildung in den Produkten zur Folge hat, als die Ursache der Veränderung anzusehen ist.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acker L., Beutler H. O., 1965. Uber die Tätigkeit der Lipasen in Getreidemehlprodukten in Abhängigkeit von der relativen Luftfeuchtigkeit. *Getreide und Mehl.*, **15**, 1, 4-6.

Caillat J. M., Drapron R., 1974. La lipase du blé : caractéristiques de son action en milieux aqueux et peu hydraté. *Ann. Technol. agric.*, **23**, 3, 273-286.

Carnovale E., Quaglia G. B., 1973. Effets de la conservation à température et humidité contrôlées sur la composition chimique des produits de mouture de mil. *Ann. Technol. agric.*, n° hors-série, 231-240.

Cerning J., 1970. Contribution à l'étude de l'évolution de la composition glucidique des céréales au cours de leur maturation : maïs, blé, orge. Thèse, Lille, n° d'enregistrement : 80.

De Stefanis V. A., Ponte J. G. Jr, 1968. Separation of sugars by thin layer chromatography. *J. Chrom.* **57**, 116-120.

Drapron R., Sclafani L., 1969. Méthode de détermination de l'activité lipolytique des produits biologiques solides ou pâteux. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 1, 5-16.

Drapron R., 1975. Méthode rapide de détermination quantitative des lipides totaux dans les produits céréaliers. *Ann. Technol. agric.* **24**, 2, 117-131.

Drapron R., Guilbot A., 1962. Contribution à l'étude des réactions enzymatiques dans les milieux biologiques peu hydratés : la dégradation de l'amidon par les amylases en fonction de l'activité de l'eau et de la température. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 3, 175-218 et **11**, 4, 275-317.

Ewers E., 1965. Determination of starch by extraction and dispersion with hydrochloric acid. International Organization for Standardization (I. S.O./TC 93/138 W.G.L.).

F.A.O., 1971. Rapport sur la conservation des farines de mil et de sorgho.

Feron F., Bouquet F., 1948. *Ann. Nutr. Alim.*, **2**, 287, in Composition des mils et des sorghos, Adrian J., Sayersec C., 1954. Dakar, Direction générale de la Santé publique, édit.

Gaitonde W. K., Dovey T., 1970. A rapid and direct method for the quantitative determination of tryptophan in the intact protein. *Biochem J.*, **117**, 907-911.

Giri K. V., Nigam V. N., 1953. Separation of simple saccharides and oligosaccharides by circular paper chromatography. *Naturw.*, **40**, 343-344.

Kaminski E., Stawicki S., Wasowicz E., 1974. *Volatil flavours* compounds produced by molds of *Aspergilus, Penicelium and Fungi imperfecti. Applied Microbiology*, **27**, 6, 1001-1004.

Nicolas J., Beaux Y., Drapron R., 1974. Les méthodes de mesure de l'activité lipoxygénasique. Mise au point d'une nouvelle méthode. *Ann. Technol. agric.* **23**, 3, 287-308.

Richard-Molard D., Drapron R., 1975. Extraction et concentration des constituants volatils des grains de céréales en vue de leur analyse par chromatographie en phase gazeuse. *Ann. Technol. agric.*, **24**, 1, 65-74.

Richard-Molard D., Cahagnier B., Poisson J., Drapron R., 1976. Surveillance du stockage des grains par la recherche en chromatographie en phase gazeuse de composés volatils d'origine microbienne. *Ann. Technol. agric.* (sous presse).

Wolf J. P., 1968. in Manuel d'analyse des corps gras. Azoulay, édit.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (3), 273-289.

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

LE CARBONE ORGANIQUE TOTAL. MÉTHODES MODERNES DE MESURE ET INTÉRÊT DE LA DÉTERMINATION DANS LES EAUX RÉSIDUAIRES

A. BORIES

Station d'Œnologie et de Technologie végétale, I. N. R. A., 11104 Narbonne Cedex

RÉSUMÉ

Les nouvelles méthodes de dosage du carbone organique dans les eaux résiduaires sont examinées : amélioration apportée aux analyseurs de carbone, oxydation par voie humide, mesures physiques et électrochimiques.

L'intérêt de cette détermination, quant à la caractérisation de la charge organique, est envisagé par comparaison du C.O.T. aux méthodes officielles (D.B.O., D.C.O.).

L'étude du bilan du carbone dans les systèmes d'épuration biologique conduit à une meilleure gestion des installations.

Au niveau du milieu récepteur, la mesure du C.O.T. contribuera à dresser l'inventaire des sources de pollution et à protéger l'équilibre des écosystèmes.

INTRODUCTION

Face à une pollution par les matières organiques très étendue et au développement des traitements d'épuration, la validité et l'efficacité des méthodes conventionnelles d'évaluation de la charge organique des eaux (demande biochimique en oxygène : D.B.O., demande chimique en oxygène : D.C.O.) sont apparues insuffisantes.

La mise au point, ces dernières années, de mesures rapides du carbone organique total (C.O.T.) a permis de disposer d'un nouveau critère d'évaluation.

L'intérêt de la mesure du contenu organique des eaux résiduaires par le C.O.T. s'affirme sur 2 plans. D'une part, elle introduit une évaluation quantitative de la matière organique que les critères classiques ne pouvaient délivrer. D'autre part, elle peut être retenue comme référence pour les mesures qualitatives de la demande en oxygène. La biodégradabilité et l'état d'oxydation de la charge organique seront évalués avec plus d'acuité.

Des exemples relevés dans la bibliographie nous permettront de dégager les relations D.B.O. C.O.T., D.C.O.-C.O.T., selon la nature des eaux résiduaires et l'état d'épuration atteint.

La mesure du carbone organique peut être appliquée à d'autres domaines concernant la pollution. Les traitements d'épuration biologique peuvent être définis et contrôlés par leur bilan de carbone. Au niveau des milieux récepteurs, la mesure du carbone contribuera à surveiller l'accumulation de substances organiques et à maintenir l'équilibre de ces systèmes.

I. — LES DIFFÉRENTES MÉTHODES DE MESURE DU CARBONE ORGANIQUE

La mesure du carbone a toujours été utilisée comme critère d'analyse de la matière organique, mais des techniques laborieuses limitaient sa pratique. Ces dernières années, de nombreux auteurs ont développé des méthodes plus rapides.

Leur principe est généralement basé sur une oxydation de la matière organique en gaz carbonique et dosage de celui-ci. Quelques travaux font appel à une mesure de la teneur en substances organiques par des procédés physiques ou électrochimiques.

A. — *Oxydation par voie humide à chaud*

L'oxydation chromique, développée par NICLOUX (1927), BOIVIN (1928), a donné lieu à de nombreuses méthodes de détermination du carbone organique, le dosage du CO_2 produit lors de l'oxydation étant réalisé selon des procédés pondéraux, titrimétriques ou gazométriques. Le mélange sulfochromique (FRIEDRICH, 1939 ; ANNE, 1945) n'assure pas l'oxydation complète de tous les composés en CO_2 (CORDEBARD, 1942). Par contre, le réactif argento-sulfochromique conduit à l'oxydation totale des composés intermédiaires (acide acétique). On doit noter, à propos de ces méthodes d'oxydation par voie humide, l'éventuelle formation, parfois non négligeable, de monoxyde de carbone.

Ces méthodes, d'une mise en œuvre aisée en regard de la combustion par voie sèche, ont été souvent appliquées au dosage du carbone des sols. Signalons pour mémoire une étude de POPOWSKY (1908), citée par CORDEBARD, concernant le dosage dans les eaux : après acidification et oxydation chromique, la détermination du CO_2 était effectuée par un indicateur de pH.

Plus récemment, des travaux ont permis d'appliquer l'oxydation par voie humide à des mesures de la charge organique des eaux.

KREY et SZEKIELDA (1965) préconisent une oxydation à 550°C par un mélange argento-sulfochromique et une mesure du CO_2 par conductimétrie. D'une durée de vingt minutes, cette technique a été utilisée pour la détermination du carbone dans l'eau de mer. Pour des effluents urbains ou industriels, une méthode simplifiée est proposée par TRIVEDI (1968). Le matériel analytique de verrerie peu complexe ici proposé est un avantage, mais le temps d'analyse de 1 h 30 mn représente un handicap pour des mesures en série.

Malgré leur amélioration, ces méthodes sont difficilement applicables au contrôle continu des rejets et des stations d'épuration.

Cependant, MORFAUX *et al.* (1972) ont mis au point une détermination automatique du carbone organique couplée à la mesure de la D.C.O. Les gaz issus de l'oxydation argento-sulfochromique, par laquelle la D.C.O. est déterminée, sont captés par une solution carbonate-bicarbonate. Un dosage par indicateur de pH délivre la teneur en carbone organique correspondant à la matière oxydée.

Une remarque commune aux méthodes d'oxydation chromique est l'influence prépondérante de la durée de chauffage sur le pourcentage d'oxydation de quelques substances, notamment certains acides organiques, acides aminés (MORFAUX *et al.*, 1974). Les composés à longue chaîne carbonée et les hydrocarbures aromatiques apparaissent réfractaires à cette oxydation (DORÉ *et al.*, 1975). Ceci peut constituer une limite à l'application de ces méthodes à certains types d'eaux résiduaires.

B. — *Combustion par voie sèche à haute température : les analyseurs de carbone*

Les travaux de Liebig en analyse organique quantitative, puis ceux de Pregl, Dennstedt en micro-analyse ont conduit à des systèmes préfigurant la génération des analyseurs de carbone organique total. Leur principe consistait en une combustion à haute température (400-500°C) en présence d'un catalyseur d'oxydation (platine) sous un courant d'oxygène et analyse de la quantité de CO_2 émise. A de telles températures, la tension de dissociation des carbonates étant négligeable, l'interférence de ces composés n'apparaît pas (Pichard, 1935).

Fastidieuses quant à la préparation du matériel, ces méthodes s'avéraient très difficiles à appliquer à des dosages de routine.

Les premiers analyseurs automatiques de C.O.T. ont été mis au point par Van Hall *et al.*, en 1963. D'un principe identique à celui exposé ci-dessus, la matière organique est oxydée par combustion à très haute température (950°C) en présence d'oxyde de cobalt et d'oxygène, le CO_2 étant dosé par absorption en infrarouge. A cette température, l'interférence des carbonates n'est plus à négliger, la mesure représentant alors le carbone total, organique et inorganique.

L'élimination du carbone inorganique était effectuée par acidification de l'échantillon puis entraînement du CO_2 dissous par un gaz inerte ou par diffusion dans une cellule de Conway (Van Hall *et al.*, 1965 ; Ford, 1968 *b*).

Afin de simplifier cette opération, un deuxième four chauffé à 150°C, garni de lamelles de quartz imprégnées d'acide phosphorique, a été mis en parallèle du four de combustion (Van Hall et Stenger, 1967).

L'injection dans ce four permettait la mesure du carbone inorganique. Par différence, le C.O.T. était ainsi déterminé.

Selon ce principe plusieurs appareils ont été diffusés : le modèle 915 Beckman, le plus répandu (fig. 1), et l'Ionics 445.

Ces analyseurs font appel à l'absorption en I.R. du CO_2 émis. Le temps d'analyse est de cinq minutes, la gamme de mesure de 50 p.p.m. à 4 000 p.p.m. Une reproductibilité de ± 2 p. 100 pour la pleine échelle est annoncée par le constructeur.

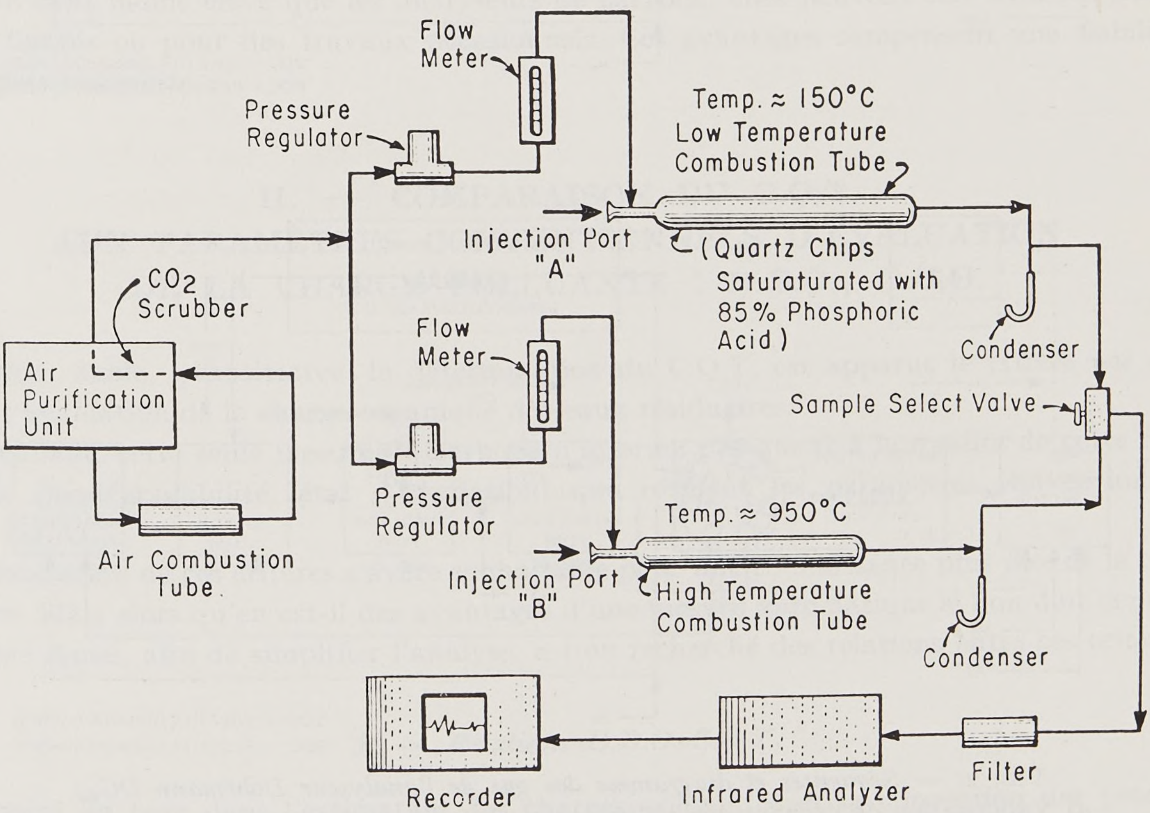


Fig. 1. — *Schéma de l'analyseur de carbone organique et inorganique Beckman* (d'après Ford, 1968 *b*)

Notons l'interférence de certains ions (nitrates, chlorures) à des concentrations de 10 g/l (FORD, 1968), la sensibilité du système de mesure à la présence d'eau dans les produits d'oxydation et enfin la perte éventuelle de substances organiques volatiles lors de la détermination du carbone inorganique.

Les derniers perfectionnements enregistrés ont été apportés par la détection par ionisation de flamme. Le CO_2 dégagé (non détecté par ionisation de flamme) est réduit en méthane dans un courant d'hydrogène en présence de nickel. L'insensibilité à l'eau de ce mode de détection, le seuil d'analyse (1 p.p.m.), la fiabilité et une gamme de mesure étendue sont des avantages introduits par cette technique.

Des appareils récents en sont équipés : le « Pyrotector 3000 » et le « Dohrmann DC 50 ». De plus, chacun de ces instruments présente de notables améliorations. Le premier cité comporte une programmation de la température du four entraînant une volatilisation fractionnée et une oxydation séquentielle de divers groupes de composés organiques. Le second apporte l'intérêt d'une mesure directe du C.O.T. (fig. 2). La vaporisation à 90°C de l'échantillon acidifié conduit à l'évacuation du CO_2 (dissous et carbonates). Les substances organiques volatilisées à cette température sont adsorbées sur une colonne garnie de Porapak. Par inversion du gaz vecteur et chauffage de la colonne, ces substances sont désorbées et dirigées vers le tube de combustion

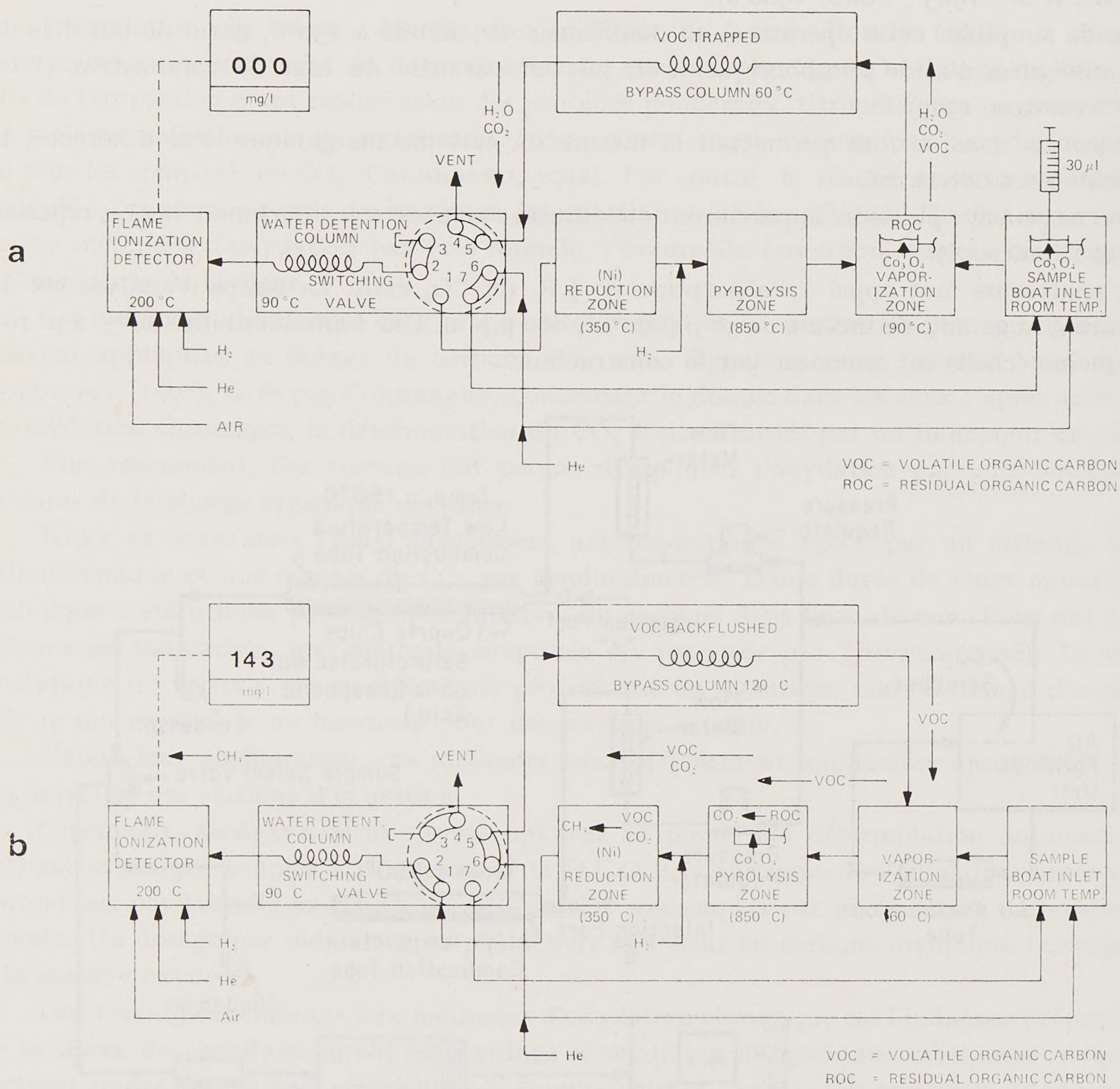


FIG. 2. — *Séquences et diagramme des gaz de l'analyseur Dohrmann* DC_{50}

a) Vaporisation de l'échantillon : élimination du carbone inorganique, piégeage des substances organiques volatiles.

b) Désorption des substances organiques volatiles, pyrolyse, réduction, détection.

dans lequel le résidu de vaporisation est également placé. Le CO_2 provenant des matières organiques volatiles et non volatiles est réduit, en présence de nickel et d'un courant d'hydrogène, en méthane alors dosé par un détecteur à ionisation de flamme. Un intégrateur incorporé délivre la teneur en C.O.T. en mg/l.

L'automatisation complète des mesures (prélèvement, analyse) réalisée par certains analyseurs (Beckman, modèle 1224 ; Ionics, Techmation ; appareil Tocsin, Intersmat) ouvre de grandes perspectives pour un contrôle efficace des rejets et des traitements (MOURGUES et MAUGENET, 1970 ; IAMMARTINO, 1972 ; MALLEVIALLE, 1974).

C. — *Autres méthodes*

Parallèlement au développement des analyseurs de carbone, des méthodes physiques ou électrochimiques ont été appliquées à la mesure du carbone organique.

FORMARO et TRASATI (1968) ont expérimenté une mesure électrochimique de la teneur en matière organique. Une électrode de platine plongée dans un liquide contenant des substances organiques les adsorbe en un film. La mesure de la capacité établie entre ce film et l'interface du liquide, assimilés à un condensateur, est en relation avec le taux de matière organique de la solution. Très sensible (0,3 p.p.m. de carbone) et rapide, elle n'est qu'expérimentale.

L'évaluation de la charge organique d'une eau par mesure de l'absorption lumineuse en ultraviolet à 254 nm est proposée par DOBBS *et al.* (1972). Pour des eaux de rivières, effluents urbains bruts et secondaires, un coefficient de haute corrélation est obtenu avec les déterminations du carbone par un analyseur. La turbidité des échantillons et la présence de minéraux ne sont pas gênants dans certaines limites. Cette méthode a été appliquée à un contrôle continu. L'interférence due aux particules en suspension peut être corrigée par mesure à la longueur d'onde 546 nm (MATTSON *et al.*, 1974).

BRAUNLICH (1973) a réalisé une mesure continue du contenu organique d'eaux résiduaires par photométrie infrarouge. Les bandes d'absorption des groupes OH et CH sont mesurées par excitation alternative des diodes à laser.

Ces méthodes se révèlent parfois très sensibles et aptes à des mesures automatiques ; de plus, d'un coût moins élevé que les analyseurs de carbone, elles peuvent être utilisées avec des budgets limités ou pour des travaux occasionnels. Ces avantages compensent une fiabilité de mesure plus restreinte.

II. — COMPARAISON DU C.O.T. AUX PARAMÈTRES CONVENTIONNELS D'ÉVALUATION DE LA CHARGE POLLUANTE : D.B.O., D.C.O.

Rapide, fiable, quantitative, la détermination du C.O.T. est apparue le critère par excellence de l'évaluation de la charge organique des eaux résiduaires.

Cependant, cette seule mesure du carbone n'informe pas quant à la qualité de cette charge polluante (biodégradabilité, état d'oxydation) que révèlent les paramètres conventionnels : D.B.O., D.C.O.

L'association de ces critères s'avère souhaitable pour une connaissance plus fine de la charge organique. Mais alors qu'en est-il des avantages d'une mesure automatique si l'on doit conserver les autres ? Aussi, afin de simplifier l'analyse, a-t-on recherché des relations entre ces critères.

A. — *Relations D.B.O.-C.O.T.*

Élément de base dans l'estimation des charges polluantes et la conception des processus d'épuration biologique, le test de la demande biochimique en oxygène est l'objet de nombreux griefs.

De par sa durée, il ne permet pas des contrôles continus des rejets et compromet l'efficacité d'un traitement.

En outre, sa validité est sujette à des conditions qui ne sont pas toujours en accord avec le but de la mesure : présence ou non de nutriments, de substances toxiques, dilutions importantes, flore non adaptée (DAVIS, 1971 ; BANERJI, 1971 ; TOUZEL, 1974). Le principe même de la consommation d'oxygène dans les conditions de l'essai peut être discuté (ALEXANDRE et GAUTHIER, 1975).

La comparaison de cette mesure à celle du carbone organique, faisant office de référence, peut amener une valorisation de ce test. L'obtention de relations permettrait l'abandon de celui-ci. Mais une telle étude doit être inscrite dans le contexte de validité de la D.B.O. en considérant la nature de l'effluent.

1. *Les eaux urbaines.*

Des conditions favorables à des mesures valides de la D.B.O. sont réunies dans les eaux urbaines : charge organique fermentescible, composition en nutriments équilibrée, absence de substances toxiques. Des relations fondées peuvent être envisagées (FORD, 1968 *a*).

Cet auteur propose un rapport théorique D.B.O.$_5$/C.O.T. = 1,85 ; DAVIS (1971) lui attribue une valeur de 2,02. Ces estimations différentes sont imputables aux proportions relatives D.B.O.$_5$/D.B.O. finale/demande totale en oxygène que leur attribuent ces auteurs.

Pour des effluents bruts, les mesures de la D.B.O. et du C.O.T. conduisent à des rapports légèrement inférieurs à ceux mentionnés ci-dessus (tabl. 1). Par contre, l'effluent primaire est affecté de valeurs nettement plus faibles (1,0 à 1,7). On peut penser qu'il est le siège d'un métabolisme oxydatif intermédiaire. Il conduirait à des composés plus oxydés sans parvenir toutefois au terme ultime (CO_2) ; il en résulterait une D.B.O. moindre pour un C.O.T. inchangé. L'effluent final, dont la matière organique résiduelle est constituée d'une forte proportion de composés réfractaires à l'oxydation biologique, est caractérisé par des rapports bien inférieurs à 1.

La recherche de corrélations D.B.O.-C.O.T. justifiée par les conditions analytiques favorables a abouti à quelques résultats. SCHAFFER *et al.* (1965) ont établi une régression linéaire entre la D.B.O. et le C.O.T. d'effluents bruts, primaires, finals (tabl. 1). Un intervalle de confiance de ± 34 p. 100 de la droite de régression est affecté d'un seuil de sécurité de 95 p. 100. GUARINO *et al.* (1972) formulent une régression linéaire entre la D.B.O., la C.D.O. et le carbone total, d'intervalle de confiance de ± 20 p. 100 au seuil de 83 p. 100. Ces écarts peuvent paraître importants, mais la seule mesure de la D.B.O. présente une déviation de ± 18 p. 100 dans des conditions analytiques rigoureuses et de ± 37 p. 100 dans des conditions moins strictes. Il paraît donc très aléatoire de vouloir relier le C.O.T., mesure précise, à la D.B.O., mesure approximative.

2. *Les effluents industriels.*

Les effluents d'industries agricoles et alimentaires réunissent pour la plupart des conditions analytiques convenables pour le test de la D.B.O. Cependant, des erreurs peuvent être introduites par d'importants facteurs de dilution nécessaires à la mesure de la D.B.O. (MOURGUES et MAUGENET, 1969, *a*, *b*). La présence de substances toxiques est aussi à redouter dans quelques cas.

Pour des rejets de laiteries, STENGER (1969) mentionne, selon le produit élaboré (lait, crème), des rapports D.B.O./C.O.T. de 1,79 et 2,13 attestant d'une biodégradabilité satisfaisante.

Les lisiers de porcheries sont, parmi les rejets d'industries agro-alimentaires, ceux dont la charge organique est une des plus fortes. Une étude de ROBBINS *et al.* (1972) a été consacrée aux relations D.B.O.-C.O.T. au cours de divers processus d'épuration (tabl. 1).

Lors d'un lagunage statique, aucune corrrélation ne peut être avancée. Des différences très marquées de l'état d'oxydation de la matière organique, la présence de substances toxiques (antibiotiques) sont à considérer dans ce résultat. Après épandage par ruissellement, une haute corrélation est établie ; il en est de même quand il est pratiqué un rejet direct dans un cours d'eau. Cet exemple souligne l'intérêt d'associer à la D.B.O. une mesure du C.O.T. Celle-ci peut être retenue comme référence ; on peut alors juger la validité de la D.B.O. et de ce fait elle est valorisée.

TABLEAU I

Relations D.B.O.-C.O.T. établies pour des eaux résiduaires urbaines et industrielles

Eaux résiduaires	Effluent	Rapport D.B.O./C.O.T.	Références	Régressions	Références
Urbaines	Brut	1,37-1,69 1,39-1,88	JONES (1972) FORD (1968 *b*)	D.B.O. = 0,61 D.C.O. — 0,72 C.T. + 36 (r = 0,89)	GUARINO *et al.* (1972)
	Primaire	1,0 -1,33 1,12-1,52 1,17-1,73	JONES (1972) STENGER et VAN HALL (1968) MASSELLI *et al.*, (1972)	D.B.O. = 1,87 C.O.T. — 11,6 (r^2 = 0,93)	SCHAFFER *et al.* (1965)
	Final	0,26-0,69 0,31-0,61 0,38-1,10	FORD (1968 *b*) JONES (1972) STENGER et VAN HALL (1968)		
D'industries agricoles et alimentaires	Laiterie	1,79-2,13	STENGER (1969)		
	Lisiers de porcherie { Épandage / Rejet dans cours d'eau	1,6		D.B.O. = 0,78 C.O.T. — 2,4 (r^2 = 0,93) D.B.O. = 1,36 C.O.T. — 8,5 (r^2 = 0,91)	ROBBINS *et al.* (1972)
D'industries chimiques	Papeterie			D.B.O. = 0,92 C.O.T. — 50 D.B.O. = 0,75 C.O.T. + 115 (r = 0,74) C.O.T. = 1,04 D.B.O. + 112,7	OSTENDORF et BYRD (1969) TAKAHASHI *et al.* (1972) * MAIER et MCCONNELL (1974)
	Textile	1,17-1,73	MASSELLI *et al.* (1972)		
	Chimie	1,28-2,53	FORD (1968 *a*)		
	Résines synthétiques	1,32	FATHMANN (1974)		
	Divers			D.B.O. = 0,97 C.T. + 54	GUARINO *et al.* (1972)

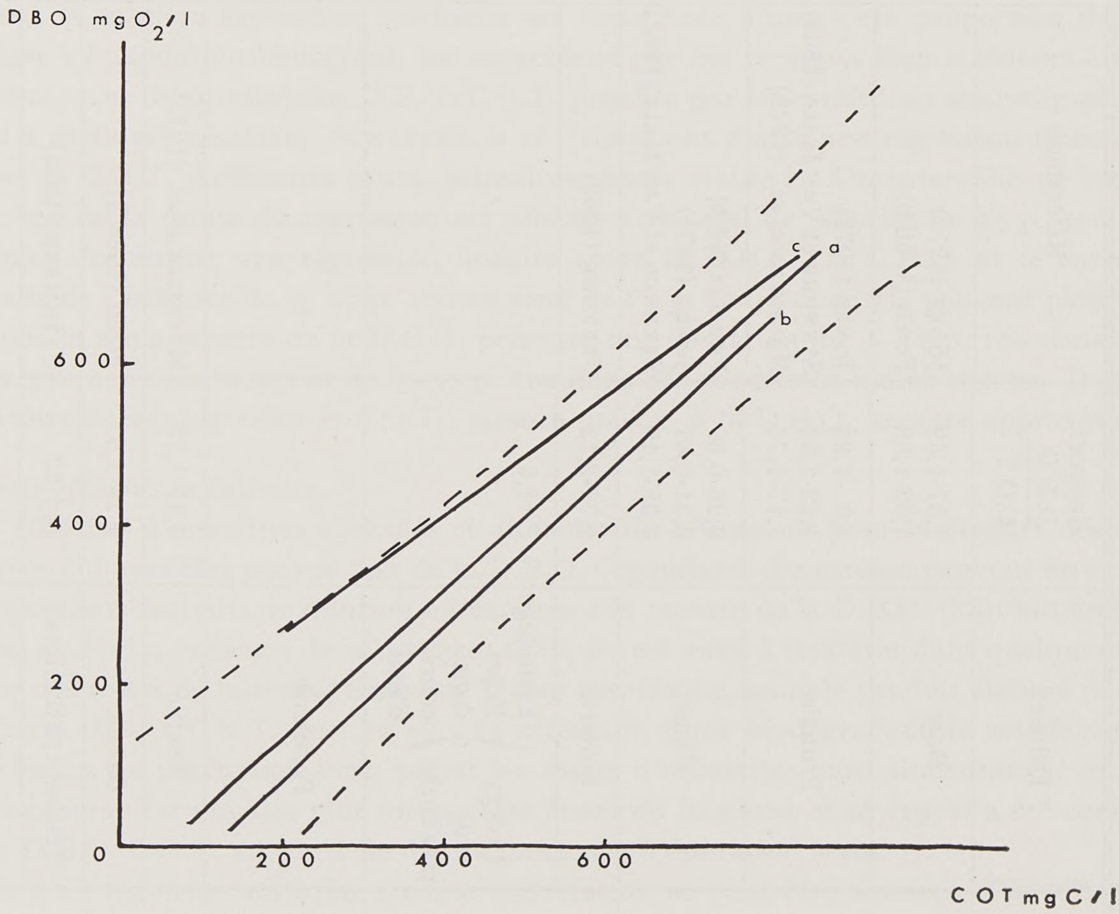
* Équation établie d'après les données (D.B.O., C.O.T.) publiées par les auteurs.

L'application de la D.B.O. à la détermination de la charge organique d'eaux résiduaires industrielles est dans bien des cas une contradiction. La toxicité ou la non biodégradabilité des effluents est la cause de cette situation .La redevance pollution, établie à partir de la D.B.O. et de la D.C.O., taxera moins une eau peu ou non dégradable qu'une eau biodégradable, à quantité égale de carbone.

L'intérêt d'une évaluation par mesure du carbone est alors évident. Cependant, il ne faut pas attribuer à tous les rejets industriels un caractère d'incapacité ou de réticence à l'oxydation biologique.

Quelques exemples concernant diverses branches de l'industrie illustreront l'étude des relations D.B.O.-C.O.T. Les papeteries, grosses consommatrices d'eau et aux rejets volumineux, offrent un intérêt particulier pour la comparaison D.B.O.-C.O.T., la charge organique de ces eaux résiduaires contenant des matières difficilement biodégradables, notamment la lignine, la cellulose (et particulièrement dans les conditions de mesure de la D.B.O.). OSTENDORF et BYRD (1969) d'une part, MAIER et McCONNELL (1974) d'autre part, font état de régressions linéaires très proches pour des effluents de papeteries (tabl. 1). Une étude de TAKAHASHI *et al.* (1972) mentionnant les D.B.O. et C.O.T. d'un effluent clarifié, nous avons établi à partir de ces données une régression linéaire d'équation D.B.O. = 0,75 C.O.T. + 115, affectée d'un coefficient de corrélation $r = 0{,}74$. La comparaison de ces droites nous fait remarquer qu'elles s'inscrivent dans l'intervalle de confiance de la première citée (fig. 3) et met en évidence d'étroites corrélations, dont l'intérêt est l'abandon de la D.B.O.

Les rapports D.B.O./C.O.T. des effluents étudiés, voisins de 1, indiquent une biodégradabilité partielle de leur charge organique.



3. — *Régressions linéaires entre la D.B.O. et le C.O.T. d'effluents de papeteries*
a) d'après OSTENDORF et BYRD (1969) ;
b) d'après MAIER *et al.* (1974) ;
c) droite établie d'après les données de TAKAHASHI (1972) ;
----- limites d'intervalle de confiance au seuil de sécurité de 95 p. 100 pour la droite (*a*)

Quant aux effluents d'industries chimiques, des rapports compris entre 1,2 et 2,5 sont relevés dans la bibliographie (tabl. 1). Mais devant la diversité des rejets il convient d'interpréter les données dans leur contexte de validité.

FATHMANN (1974) mentionne pour un effluent de synthèse de résines un rapport de 1,3. L'épuration biologique conduit à une réduction de la D.B.O. de 99 p. 100 mais le C.O.T. du rejet final représente 18 p. 100 du carbone initial et apparaît d'une biodégradabilité nulle (D.B.O./C.O.T. < 0,1).

A la lumière des comparaisons effectuées pour les divers types d'eaux résiduaires, on peut dégager les points suivants.

Les mesures conjointes D.B.O., C.O.T. fournissent un indice de biodégradabilité exprimé par le rapport D.B.O./C.O.T. Voisin de 1,8, il témoigne d'un contenu organique biodégradable dans une large proportion (MASSELLI *et al.*, 1972). A l'inverse, des valeurs proches de 0,5 évoqueront une très faible aptitude à une épuration biologique due, soit à la nature particulière de la matière organique, soit à une toxicité de l'eau résiduaire (JONES, 1972). Pour des valeurs intermédiaires, 2 cas sont à considérer : ou bien une oxydation biologique de la matière organique est engagée mais de façon partielle, ou alors une quantité non négligeable de composés réfractaires à une biodégradation est à suspecter.

Pour un effluent donné, l'efficacité d'un processus d'épuration biologique sera définie et contrôlée par la valeur de ce rapport.

Pour peu qu'une eau résiduaire se prête à des mesures correctes de D.B.O., une corrélation D.B.O.-C.O.T. est envisageable. Une condition nécessaire est l'homogénéité de la composition du rejet. Les régressions linéaires mises en évidence pour des rejets très divers (eaux domestiques, lisiers de porcherie, papeteries) sont en faveur de recherches plus étendues dont l'intérêt est la substitution d'une mesure longue et peu précise par une analyse rapide, automatique et fiable.

B. — *Relations D.C.O.-C.O.T.*

Introduite afin de complémenter la D.B.O., la D.C.O. s'est avérée une mesure fondamentale, très souvent considérée comme une mesure effective de la charge organique. Mais peut-on retenir cette quantité d'oxygène requise pour l'oxydation chimique de la matière organique en tant que critère quantitatif ? Très satisfaisante quant à l'analyse de substances définies (CORDEBARD, 1942), cette méthode argento-chromométrique l'est moins quand on l'applique à des mélanges complexes que sont les eaux résiduaires. Pour un effluent donné, de composition constante, la D.C.O. reflètera effectivement des variations de charges. Mais pour des rejets divers elle ne traduira pas intimement leur charge organique.

Le C.O.T. se substituera avantageusement à la D.C.O. pour l'évaluation quantitative. Par association de ces 2 critères, on accèdera à un état d'oxydation de la charge organique exprimé par le rapport de la D.C.O. au C.O.T.

Pour situer ce rapport, on peut lui attribuer pour référence la valeur stoechiométrique $\frac{O_2}{C} = 2{,}66$. Ses limites théoriques vont de 0 pour des composés réfractaires à l'oxydation chromique (benzène) à 5,3 pour le méthane (FORD, 1968 *b*). Des composés inorganiques réducteurs (sulfures, sulfites) interférant dans la D.C.O. contribuent à une augmentation de ces valeurs.

Nous considérerons successivement la comparaison D.C.O.-C.O.T. pour les eaux domestiques et les eaux résiduaires industrielles. La signification du rapport D.C.O./C.O.T. au cours de l'épuration sera discutée.

1. *Les eaux urbaines.*

Les rapports D.C.O./C.O.T. d'effluents bruts et primaires montrent une très grande variabilité (tabl. 2). Il est surprenant d'observer une telle dispersion compte tenu de la reproductibilité de la D.C.O., de l'homogénéité de ces eaux et de leur nature facilement oxydable. Ces écarts sont-ils imputables à des états d'oxydation de la matière organique très différents ou à des lacunes

TABLEAU 2

Relations D.C.O.-C.O.T. relevées pour diverses eaux résiduaires

Eaux résiduaires	Type d'effluent	Rapport D.C.O./C.O.T.	Régressions	Références
Urbaines	Brut	3,30-4,60 2,56	D.C.O. = 3,50 C.O.T. — 20,3 (r^2 = 0,96)	FORD (1968 *a*) SCHAFFER *et al.* (1965)
	Primaire	3,19-5,85 2,65-3,40 2,65		FORD (1968) STENGER et VAN HALL (1968) SCHAFFER *et al.* (1965)
	Final	2,02-2,58 2,30-3,10 2,23		FORD (1968) STENGER et VAN HALL (1968) SCHAFFER *et al.* (1965)
D'industries agricoles et alimentaires	Laiterie	2,65-3,03		STENGER (1969)
D'industries chimiques	Résines synthétiques : brut épuré	1,60 0,52	D.C.O. = 4,44 C.O.T. — 75** D.C.O. = 3,33 C.O.T. — 15	FATHMANN (1974)
	Ethylcellulose Nitrophénols	3,74 2,93		STENGER et VAN HALL (1968)
	Raffinerie Pétrochimie Divers	6,60* 4,35 3,00 2,40		FORD (1968 *a*, *b**)

*Effluent contenant des sulfures.

**Équation établie d'après la droite.

de l'échantillonnage ? L'homogénéité des valeurs notées pour l'effluent final (2,2 à 2,7) nous conduit à penser que les variations des niveaux d'oxydation seraient responsables de la dispersion de ces données.

La diminution du rapport constatée malgré tout pour l'effluent final souligne une matière organique résiduelle plus oxydée et une oxydabilité par voie chimique encore aisée.

De tels écarts ne sont pas en faveur d'étroites corrélations. Cependant une étude de Schaffer *et al.* (1965) mentionne une régression linéaire entre la D.C.O. et le C.O.T. d'un effluent brut, primaire, final dont l'intervalle de confiance est $\pm$ 35 p. 100 au seuil de 95 p. 100 (tabl. 2).

2. *Les eaux résiduaires industrielles.*

La comparaison D.C.O.-C.O.T. revêt un intérêt plus vif pour des effluents d'industries chimiques. En effet, des composés organiques très condensés en carbone : hydrocarbures, acides gras par exemple, sont souvent caractéristiques de ces eaux résiduaires et leur oxydation partielle par le bichromate conduit à des évaluations erronées de la charge polluante. La mesure du C.O.T. s'impose afin d'estimer réellement la charge organique et de mettre en évidence ces cas particuliers.

Les eaux résiduaires de synthèse de nitrophénols, éthylcellulose, sont dotées de rapports compris entre 2,4 et 4,3 (tabl. 2). Des rejets contenant des sulfures sont caractérisés par des valeurs D.C.O./C.O.T. très élevées : 6,6 (Ford, 1968 *a*).

En reprenant l'exemple des rejets de synthèse de résines, un rapport D.C.O./C.O.T. de 1,6 est mentionné pour l'effluent brut. Cette valeur traduit déjà une charge organique difficilement oxydable par voie chimique. Après épuration par oxydation biologique, une valeur de 0,5 indique une matière organique non oxydable (chimiquement et biologiquement).

Les effluents de raffinerie et de pétrochimie selon Ford (1968 *b*) sont aptes à de bonnes corrélations D.C.O.-D.O.T.

L'examen d'une droite de régression est susceptible de mettre en évidence des lacunes de la D.C.O. Son intersection avec l'axe de la D.C.O. fera suspecter une interférence due à des composés inorganiques réducteurs (sulfures). Par contre, l'intersection avec l'axe du C.O.T. sera indicative d'une oxydation partielle de la matière organique.

3. *Évolution du rapport D.C.O./C.O.T. au cours de l'épuration.*

Par ailleurs, il a été indiqué une diminution du rapport D.C.O./C.O.T. au cours des processus d'épuration par oxydation biologique (Ford, 1968 ; Morfaux *et al.*, 1972). L'interprétation de ce phénomène doit être abordée avec les éventualités suivantes :

perte de substances inorganiques réductrices,

perte de substances volatiles à forte D.C.O.,

présence de composés organiques partiellement oxydés par le dichromate,

le processus de biodégradation n'est pas complet et conduit à des intermédiaires plus oxydés.

Les 2 premiers cas sont inhérents à la nature de l'effluent ; ils peuvent être aisément vérifiés. Par contre, les deux autres possibilités ne peuvent être dissociées. Afin d'obvier à l'inconvénient d'une oxydation incomplète, Morfaux *et al.* (1972) proposent une mesure du carbone organique sur le produit résultant de l'oxydation chromique : le gaz carbonique. Ainsi les matières non oxydées ne sont pas incluses dans la mesure du carbone et de ce fait le rapport D.C.O./carbone organique traduira un réel changement qualitatif.

En conclusion, la comparaison de la D.C.O. au C.O.T. conduit à formuler un état d'oxydation caractérisant une eau résiduaire donnée et reflétant pour un effluent déterminé le degré d'épuration susceptible d'être atteint. Elle met en évidence les lacunes de D.C.O. et la prudence avec laquelle on doit interpréter une seule mesure de celle-ci.

4. *La demande totale en oxygène (D.T.O.).*

Développée parallèlement à la mise au point des analyseurs de carbone, cette méthode apparaît comme un complément moderne du C.O.T. et le moyen de substitution de la D.C.O.

Sa détermination consiste en une oxydation totale des constituants d'une eau résiduaire (carbone, hydrogène, azote et soufre) par combustion à 900°C sous courant d'oxygène en présence d'un catalyseur (Stenger et Van Hall, 1968 ; Clifford, 1968). L'oxygène consommé par cette réaction est déterminé selon divers procédés : cellule du type pile électrolytique, cellule du type solide à l'oxyde de zirconium. Automatisée sous forme d'analyseur, la mesure est réalisée en trois minutes ; elle s'intègre facilement à des contrôles *in situ*. Arin (1974) cite les constructeurs et les caractéristiques de divers instruments.

Récemment le couplage D.T.O.-C.O.T. en une même unité a été réalisé (Astro Ecology Corp., Houston).

Cette mesure tend à s'identifier à la demande théorique en oxygène, paramètre de base des concepts des systèmes biologiques. Pour des traitements d'épuration biologique, la D.T.O. surestimera la demande en oxygène de la charge organique du fait d'une cinétique lente de certains processus (substances organiques difficilement dégradables, nitrification...). Pour un effluent épuré, pour lequel la D.B.O., la D.C.O. ne sont plus significatives vis-à-vis des besoins en oxygène à long terme, la D.T.O. introduit une évaluation plus juste. Raisonner sur la D.T.O. et le C.O.T. et non plus sur la DBO_5, la D.C.O. devrait être l'apport de ces méthodes modernes.

III. — AUTRES DOMAINES D'APPLICATION DE LA MESURE DU CARBONE

A. — *Les bilans de carbone.*

Les systèmes biologiques peuvent être définis par le carbone organique dissous (C.O.D.) : substrat énergétique, le carbone organique en suspension (biomasse) et le carbone inorganique

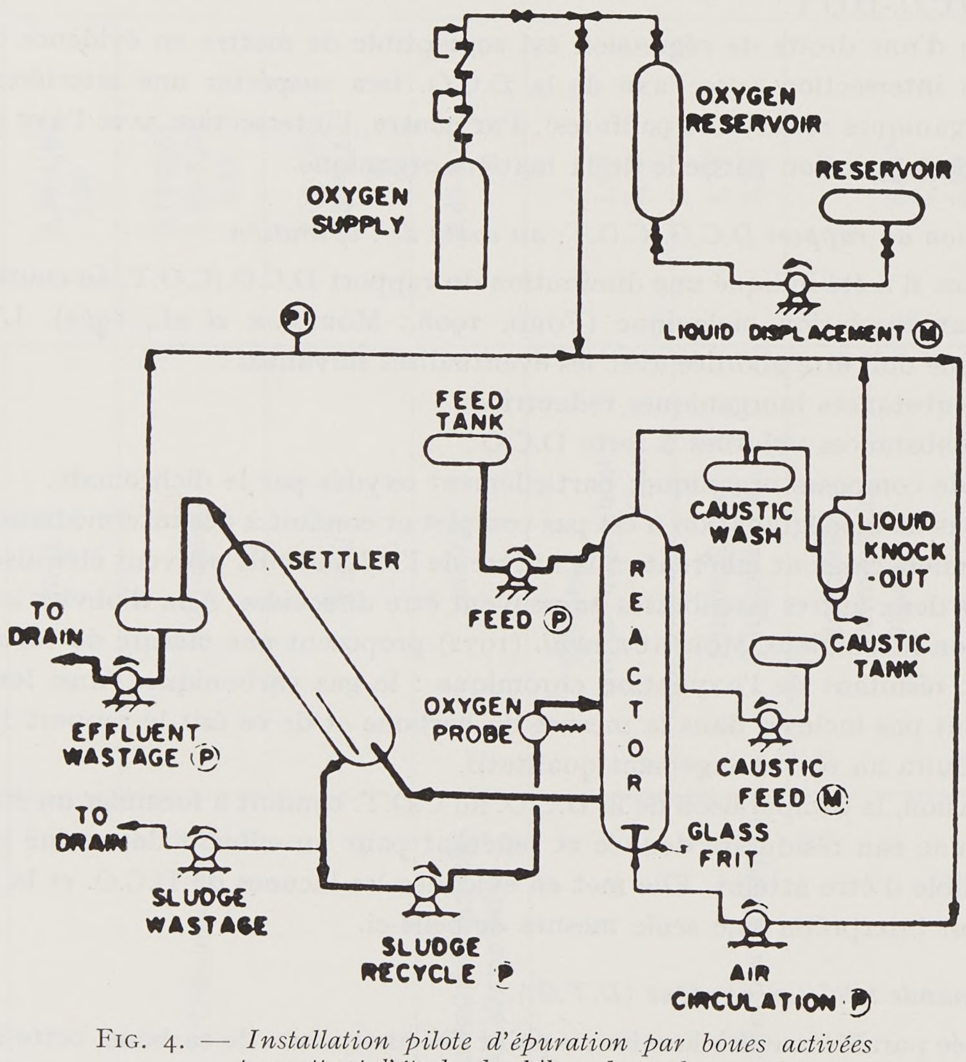


Fig. 4. — *Installation pilote d'épuration par boues activées permettant l'étude du bilan de carbone*
(d'après Lamb et Tollefson, 1972)

dissous et gazeux (Hiser, 1970). Des dispositifs expérimentaux permettent l'étude des bilans de carbone (fig. 4) et grâce à la rapidité de mesure la dynamique des phénomènes peut alors être abordée. L'application aux systèmes d'épuration biologique s'avère primordiale pour l'efficacité et l'optimisation des traitements.

Un bilan de carbone présenté par Schaffer *et al.* (1965) pour une station urbaine à partir de l'effluent brut peut être schématisé comme indiqué ci-après :

Carbone organique de l'effluent brut 100 p. 100	Boues primaires et déchets	19 p. 100		
	Effluent primaire.......	74 p. 100	Boues produites....	40 p. 100
			Effluent final	30 p. 100
			Rejet gazeux	17 p. 100

Au niveau d'une station d'épuration, la mesure du C.O.D. de l'effluent conduira à un contrôle de la charge appliquée dont l'intérêt principal sera d'éviter de graves déséquilibres, phénomènes trop souvent rencontrés actuellement.

Appliquée à l'effluent final, la mesure du C.O.T. indique le rendement de l'installation et peut aboutir à une optimisation du traitement.

Un autre intérêt est de mieux adapter les traitements et de concevoir les critères des installations.

Lacroix et Bloodgood (1972), à partir des balances de matières, ont étudié la simulation d'une station d'épuration par boues activées. Les paramètres du système (matières en suspension, recyclage des boues, D.B.O.) sont établis d'après un modèle mathématique. Une étude similaire sur un réacteur clos a été réalisée par Fairall (1972).

Un point fondamental de l'épuration biologique par boues activées, les besoins en oxygène, peut être cerné plus précisément en se référant à un bilan de carbone. Ceux-ci, déduits des mesures de D.B.O., ne sont pas toujours définis à leurs plus justes valeurs, notamment pour des fortes charges (industries agro-alimentaires).

Par contre, les bilans de carbone et d'oxygène aideront à mieux chiffrer l'oxygène nécessaire à la dégradation des substrats et à la respiration endogène des boues.

B. — *Qualité des eaux*

Malgré un développement des traitements d'épuration, une forte proportion d'eaux résiduaires est encore rejetée telle quelle. Aussi, parallèlement à l'inventaire des sources de pollution et à leur maîtrise, il convient de surveiller étroitement le milieu récepteur. Mais la faible teneur en carbone, la nature souvent particulière des composés (hydrocarbures, pesticides...) et un nombre d'analyses trop élevé ne sont pas en faveur de ces méthodes.

Par contre, l'automaticité et la sensibilité des analyseurs de carbone sont des critères décisifs pour le choix du C.O.T. comme mesure primaire pour l'inventaire de la pollution des eaux naturelles.

Au niveau des cours d'eau, récepteurs et vecteurs de la pollution, un contrôle déterminera les secteurs critiques en vue de développer les programmes d'abattement de pollution.

Maier et McConnell (1974) notent une augmentation du C.O.T. des cours d'eau du Minnesota en progressant vers l'aval ainsi que des variations saisonnières. Au mois d'août est relevée la plus forte teneur (25 à 40 mg de carbone/l). A cette période correspond un faible débit et une activité photosynthétique intense. Au printemps, la plus faible teneur est enregistrée (10 à 15 mg/l). Des observations identiques pour des cours d'eau de Californie sont reportées par Helms (1970).

Pour les lacs, l'intérêt de la mesure du carbone, sous ses diverses formes, réside dans l'étude et le maintien de l'équilibre dans la hiérarchie des systèmes biologiques (algues, bactéries, protozoaires, macro-organismes). Il est relevé dans la bibliographie des teneurs de 5 à 17 mg de carbone/l pour des lacs de Suède, et de 2 à 8 mg/l pour le Lac Supérieur (Maier et McConnell, 1974).

Helms (1970) mentionne pour les eaux de surface du littoral du Pacifique, des concentrations relativement élevées : 3,7 à 7,7 mg de carbone/l, dont l'origine est attribuée plus à une côte très boisée qu'à une pollution engendrée par l'homme.

Ces connaissances sont encore fragmentaires et il est nécessaire de les étendre à tous les domaines de l'eau. Cela demande d'importants moyens financiers et techniques.

CONCLUSIONS

Les progrès technologiques réalisés ces dernières années dans les méthodes de détermination du carbone ont abouti à de multiples applications dans la maîtrise de la pollution et principalement aux 3 niveaux d'actions : inventaire et contrôle des rejets, processus d'épuration, protection du milieu récepteur.

C'est pour le premier point que s'est manifesté le plus fortement l'intérêt de la détermination du C.O.T. Représentant la mesure réelle de la charge organique, le C.O.T., associé aux tests de la demande en oxygène, délivre alors une information plus juste sur la biodégradabilité et l'état d'oxydation d'un rejet, concourant à le définir avec plus de précision. Ainsi caractérisée, la charge organique d'un effluent donné peut être contrôlée par la seule mesure du C.O.T.

Les perspectives d'applications du C.O.T. dans les processus d'épuration se sont révélées non moins importantes. En premier lieu, l'étude des rapports D.B.O./C.O.T. et D.C.O./C.O.T. peut caractériser le degré d'épuration d'un effluent. C'est un élément directement applicable à la surveillance d'un bon déroulement du processus d'épuration. En second lieu, une étude approfondie de la distribution du carbone sous ses différentes formes par les bilans de carbone assure une optimisation des traitements pouvant déboucher sur un contrôle automatique de l'installation. Enfin, c'est au niveau de la conception de nouveaux processus que peut se manifester la mesure du carbone. Connaissant les bilans de carbone de systèmes expérimentaux et en leur appliquant un modèle mathématique, on peut concevoir des installations à haut rendement, adaptées à un effluent donné. Cette échéance peut paraître lointaine, mais pourtant elle est la base d'une lutte efficace et rationnelle.

Si l'on connaît dans l'ensemble les sources de pollution et si l'on sait appliquer des traitements efficaces, la distribution du carbone dans le milieu récepteur est encore dans bien des cas une inconnue. Il s'avère pourtant essentiel de surveiller étroitement ce phénomène afin de protéger les écosystèmes d'un déséquilibre du cycle du carbone et de l'accumulation de substances réfractaires à une dégradation biologique dont les effets à long terme demeurent inconnus.

Reçu pour publication en août 1976.

SUMMARY

TOTAL ORGANIC CARBON. MODERN METHODS FOR MEASURING AND ADVANTAGE OF THE DETERMINATION IN WASTE WATER

The new methods for the determination of organic carbon in waste water are studied : improvements in carbon analysers, wet oxidation, physical and electrochemical measurements.

The advantage of this determination as far as the characterizing of the organic load is concerned is faced in comparing T.O.C. with the official methods (D.B.O. and C.O.D.).

The study of carbon balance in the systems of biological purifying leads to a better management of the plant.

As for the receptive medium the T.O.C. measurement will contribute to the inventory of the pollution sources and protection of the ecosystem equilibrium.

RESUMEN

EL CARBONO ORGANICO TOTAL. MÉTODOS MODERNOS DE MEDICION E INTERÉS DE SU DETERMINACIÓN EN LAS AGUAS RESIDUALES

Se examinan en este artículo los nuevos métodos para la dosificación del carbono organico en las aguas residuales : mejoras introducidas en los analizadores de carbono, oxidación por vía húmeda, mediciones físicas y electroquímicas.

El interés que presenta semejante determinación, por lo que se refiere a la caracterización de la carga orgánica, es examinado por comparacíon con el carbono orgânico total (C.O.T.) con los métodos oficiales (D.B.O., D.C.O.).

El estudio del balance del carbono en los sistemas de depuracíon biológica conduce a une mejor gestión de las instalaciones.

A nivel del medio receptor, la medición del C.O.T. habra de contribuir a levantar el inventario de las fuentes de contaminación y a proteger el equilibrio de los ecosistemas.

RIASSUNTO

IL CARBONIO ORGANICO TOTALE. METODI MODERNI DI MISURA E INTERESSE DELLA DETERMINAZIONE DELLE QUANTITA' CONTENUTE NELLE ACQUE RESIDUALI

Sono esaminati i nuovi metodi di dosaggio del carbonio organico nelle acque residuali : miglioramento apportato agli analizzatori di carbonio, ossidazione per via umida, misura fisiche ed elettrochimiche.

L'interesse di questa determinazione, relativamente alla caratterizzazione della carica organica, è considerato mediante confronto del C.O.T. ai metodi ufficiali (D.B.O., D.C.O.).

Lo studio del bilancio carbonico nei sistemi di depurazione biologica porta a una migliore gestione degli impianti.

Al livello del mezzo ricevente, la misura del C.O.T. contribuirà a compilare l'inventario delle sorgenti d'inquinamento e a proteggere l'equilibrio degli ecosistemi.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALEXANDRE D., GAUTHIER M., 1975. Apport de l'analyse chimique au traitement des effluents domestiques et industriels. *B. I. S. T. Commissariat à l'énergie atomique*, (200), 123-128.

ANNE P., 1945. Sur le dosage rapide du carbone organique des sols. *Ann. agron.*, **15**, 161-172.

ARIN M. L., 1974. Monitoring with carbon analysers. *Environmental Sci. Technol.*, **8**, 898-902.

BANERJI S. K., 1971. Laboratory tests for plant operation control and stream quality measurement. *J. Water Poll. Control Feder.*, **43**, 399-406.

BOIVIN A., 1928. Contribution à l'étude de l'oxydation sulfochromique des substances carbonées. Méthodes générales du microdosage du carbone par voie humide. *C. R. Acad. Sci.*, 1076-1079.

BRAUNLICH G., 1973. Continuous determination of organic substances in waste water by infrared photometry. *Ger. Offen.*, **2**, 164-670. June 28 (Chem. Abs., **79**, 83238, 1973), cité par BREZONIK P. L., 1974. Continuous monitoring, automated analysis and sampling procedures. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **46**, 1100-1109.

CLIFFORD D. A., 1968. Automatic measurement of total oxygen demand. A new instrumental method. *23rd Ann. Purdue Ind. Waste Conf. Purdue Univer.*

CORDEBARD H., 1942. L'oxydation chromique en analyse quantitative, 405 p. Société d'Impressions typographiques, Nancy.

DAVIS E. M., 1971. B.O.D. vs C.O.D. vs T.O.C. vs T.O.D. *Water and Wastes Engng*, (2), 32-38.

DOBBS R. A., WISE R. H., DEAN R. B., 1972. The use of ultra-violet absorbance for monitoring the total organic carbon content of water and wastewater. *Water Res.*, **6**, 1173-1180.

DORÉ M., BRUNET N., LEGUBE B., 1975. Participation de différents composés organiques à la valeur des critères globaux de pollution. *Tribune Cebedeau*, **28**, 3-11.

FAIRALL J. M., 1972. Simulated reactor kinetics for closed systems. *J. Water. Poll. Contr. Feder.*, **44**, 1968-1986.

FATHMANN H., 1974. Épuration biologique des eaux résiduaires fortement chargées provenant de la production de résines synthétiques. *Tribune Cebedeau*, **27**, 392-396.

FORD D. L., 1968 *a*). Application of the total carbon analyser for industrial waste water evaluation. *23rd industrial Waste Conf. Purdue University.*

FORD D. L., 1968 *b*). Total organic carbon as a waste water parameter *Public Works*, **99**, 89-92.

FORMARO L., TRASATI S., 1968. Capacitance measurements on platinium electrodes for the estimation of organic impurities in water. *Anal. Chem.*, **40**, 1060-1065.

FRIEDRICH A., 1939. La pratique de la micro-analyse organique quantitative, 110-111, Dunod, Paris.

GUARINO C. F., GILMAN H. D., NELSON M. D., KOCH C. M., 1972. Computer control of waste water treatment. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **44**, 1718-1729.

HELMS J. W., 1970. Rapid measurement of organic pollution by total organic carbon and comparisons with other techniques. *Reprint R* 4373, Beckman-Fullerton, California.

HISER L. L., 1970. A new approach to controlling biological processes. *Environmental Sci. Technol.*, **4**, 648-651.

IAMMARTINO N. R., 1972. Water monitoring online. *Chemical Engng*, November 13, 82-84.

JONES R. H., 1972. T.O.C. : How valid is it? *Water Wastes Engng*, **4**, 32-33.

KREY J., SZEKIELDA K. H., 1965. Bestimmung das organisch gebundenen Kohlenstoffs im Meerwasser mit einen neuen Gerät zur Analyse sehr Kleiner Mengen CO_2. *Zeitschrift fur Anal. Chem.*, 338-346.

LACROIX P. G., BLOODGOOD D. E., 1972. Computer simulation of activated sludge plant operation. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **44**, 1778-1788.

LAMB A., TOLLEFSON E. L., 1972. The use of carbon mass balances in the study of biological oxidation *The Canadian J. Chem. Engng.*, **50**, 173-178.

MAIER W. J., MCCONNELL H. L., 1974. Carbon measurements in water quality monitoring. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **46**, 623-633.

MALLEVIALLE J., 1974. Identification et dosage des organites présents à l'état de traces dans les eaux. *La technique de l'eau*, (335), Nov., 17-30.

MASSELLI J. W., MASSELLI N. W., BURFORD G., 1972. B.O.D. ? C.O.D. ? T.O.D. ? T.O.C. ? *Textile Ind.*, **136**, 53-60.

MATTSON J. S., SMITH C. A., JONES T. T., GERCHAKOV S. M., EPSTEIN B. D., 1974. Continuous monitoring of dissolved organic matter by U.V. visible photometry. *Limnol. oceanogr.*, **19**, 530-535.

MORFAUX J.-N., SARRIS J., CATROUX G., 1972. Relation entre la D.C.O. et le carbone organique des eaux résiduaires. Intérêt d une méthode automatique de détermination simultanée de ces paramètres. *Ind. aliment. agric.*, (11), 1579-1587.

MORFAUX J.-N., SARRIS J., 1974. Détermination automatique de la D.C.O. Étude critique de l'oxydation de quelques corps purs. *Tribune Cebedeau*, **27**, 97-104.

MOURGUES J., MAUGENET J., 1969 *a*. Méthodes d'évaluation et valeurs de la charge polluante des eaux résiduaires des industries alimentaires. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 45-65.

MOURGUES J., MAUGENET J., 1969 *b*. Évaluation de la charge polluante des eaux résiduaires des distilleries vinicoles. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 129-137.

MOURGUES J., MAUGENET J., 1970. L'épuration des eaux résiduaires des distilleries vinicoles. *Tribune Cebedeau*, (315), 76-85.

NICLOUX M., 1927. Microdosage du carbone. Applications. *C. R. Acad. Sci.*, 890-892.

OSTENDORF R. G., BYRD J. F., 1969. Modern monitoring of a treated industrial effluent. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **41**, 89-98.

PICHARD G., 1935. Dosage du carbone organique dans les terres. *Ann. agron.*, **5**, 553-558.

ROBBINS J. W. D., KRIZ G. J., HOWELLS D. H., 1972. Total organic carbon determinations on swine waste effluents. *Transactions of the A. S. A. E.*, (15), 105-109.

SCHAFFER R. B., VAN HALL C. E., MCDERMOTT G. N., BARTH D., STENGER V. A., SEBESTA S. J., GRIGGS S. H., 1965. Application of a carbon analyser in waste treatment. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **37**, 1545-1566.

STENGER V. A., VAN HALL C. E., 1968. Analyses of municipal and chemical waste waters by an instrumental method for C.O.D. determination. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **40**, 1755-1763.

Stenger V. A., 1969. Rapid analysis for the organic carbon content and oxygen demand of waste water. *Proc. 17th Ann. Nat. Dairy Engng. Conf. Michigan State University.*

Takahashi Y., Moore R. T., Joyce R. J., 1972. Direct determination of organic carbon in water by reductive pyrolysis. *Amer. Laboratory*, **4**, 31-38.

Touzel J.-P., 1974. La demande biochimique en oxygène. Détermination et valeur de la mesure. *Ann. Technol. agric.*, **23**, 97-111.

Trivedi R. C., 1968. Simple method for quantitative estimation of carbon in sewage, industrial effluents and sludges. *Environmental Health*, **10**, 129-134.

Van Hail C. E., Safranko J., Stenger V. A., 1963. Rapid combustion method for the determination of organic substances in aqueous solutions. *Anal. Chem.*, **35**, 315-319.

Van Hall C. E., Barth D., Stenger V. A., 1965. Elimination of carbonates from aqueous solutions prior to organic carbon determination. *Anal. Chem.*, **37**, 769-771.

Van Hall C. E., Stenger V. A., 1967. An instrumental method for rapid determination of carbonate and total carbon in solutions. *Anal. Chem.*, **39**, 503-507.

annales de technologie agricole

Trimestriel

1976

Vol. 25 N° 4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (4), 291-307.

INFLUENCE DE L'IRRADIATION INFRAROUGE ET DE L'APLATISSAGE SUR LA FRAGMENTATION, LA COMPOSITION DU MAIS-GRAIN ET SUR L'ÉTAT DE SON AMIDON

P. COLONNA, J. P. MELCION * et Christiane MERCIER

avec la collaboration technique de Josette RAULT

Laboratoire de Biochimie des Aliments
et
* *Laboratoire de Technologie des Aliments des Animaux,*
Centre de Recherches de Nantes, I. N. R. A.
Chemin de la Géraudière
44072 Nantes

RÉSUMÉ

L'influence des différentes étapes du traitement d'irradiation infrarouge du maïs-grain — irradiation infrarouge proprement dite, aplatissage et refroidissement par cyclone — sur la composition biochimique globale de maïs à teneur en eau comprise entre 13 et 16 p. 100 et l'état de leur amidon a été examinée.

Le bilan de fonctionnement de l'appareil, effectué sur 500 kg de maïs, a été de 97,0 p. 100 par rapport au maïs infranisé sec et le rendement de récupération total de la matière sèche de 98,4 p. 100.

L'irradiation infrarouge seule, ainsi que l'aplatissage sans irradiation préalable, ne modifient pas la composition biochimique du maïs. Par contre, les deux traitements augmentent la sensibilité des produits à l'α-amylolyse, par endommagement des grains d'amidon.

L'effet des applications successives de l'irradiation infrarouge et de l'aplatissage conduit à un produit à particules de dimensions très hétérogènes, formé d'environ 90 p. 100 de flocons et d'environ 10 p. 100 de particules fines. L'étude de leur composition a révélé que les flocons, enrichis en amidon et appauvris en glucides de structure, lipides et matières minérales, correspondent essentiellement à des fractions de l'albumen du maïs alors que les particules fines sont plus riches en fractions de tégument et de germe.

Dans le cas où le produit commercialisé est homogénéisé par un broyage ultérieur, le traitement d'irradiation infrarouge n'a pas d'effet sur la composition biochimique du produit. Par contre, il valorise toujours la digestibilité de l'amidon *in vitro*. La très facile ségrégation du produit infranisé en particules fines et en flocons conduit à un aliment de valeur énergétique variable du fait de la différence de composition chimique de ces deux fractions. Il est vraisemblable que ce phénomène ait pu conduire à fausser les résultats d'essais *in vivo*.

Mots clés : *irradiation, infrarouge, aplatissage, micronizing, maïs-grain, composition biochimique, amidon.*

INTRODUCTION

Le traitement d'irradiation infrarouge des céréales est un procédé développé aux U.S.A., principalement au Texas, depuis une dizaine d'années (HINDERS et ENG, 1970), dans le but d'améliorer leur valeur énergétique pour les animaux en croissance, au même titre que les traitements dits de floconnage, d'expansion ou d'extrusion (MERCIER, 1971).

Désigné sous le terme anglo-saxon de « micronizing », ce procédé a connu un certain développement en Europe (LIVINGSTONE, 1973) pour son application au maïs-grain à l'état sec. Ainsi, récemment, LAWRENCE (1973 a et b, 1975) a rapporté les résultats de croissance de porcs nourris avec trois céréales (blé, orge, maïs), soumises à l'action de l'irradiation infrarouge. En France, des essais furent effectués aussi bien sur des porcs (TARDIF et LEUILLET, 1976) que sur de jeunes bovins (I. T. C. F., 1974). Au cours de ces expériences, un effet bénéfique du traitement sur le gain de poids journalier des porcs et des bovins fut observé, sans augmentation des quantités consommées. Pour l'expliquer, LAWRENCE (1973 a et b, 1975) avance certaines hypothèses : entre autres, la modification de la teneur de certains nutriments du maïs traité et l'augmentation de la digestibilité *in vitro* de l'amidon. Ce dernier point confirmerait les résultats antérieurs de MERCIER (1971).

A ce jour, aucune étude systématique de l'influence des différentes étapes du traitement sur la composition chimique et la structure physico-chimique des constituants du maïs n'a été entreprise, notamment sur l'amidon, qui, en tant que composant majeur du maïs, représente la principale source énergétique de l'aliment. Or, il a été démontré par MERCIER, CHARBONNIÈRE et GUILBOT (1968), MERCIER (1971), MERCIER et GUILBOT (1974) et DELORT-LAVAL et MERCIER (1976) que les traitements technologiques traditionnels modifient les caractéristiques physico-chimiques de l'amidon et augmentent sa digestibilité *in vitro*.

C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude de l'évolution de la composition globale et plus spécialement de la fraction glucidique du maïs-grain au cours des différentes étapes du procédé industriel de traitement infrarouge. De plus, un essai de bilan de la chaîne industrielle a été effectué.

Pour éviter l'emploi du terme « micronisé » signifiant « réduit en particules fines » dans la langue française, les termes de maïs infranisé pour désigner le produit fini commercialisable et d'irradiation infrarouge pour désigner le traitement complet (irradiation + aplatissage) seront utilisés au cours de cette étude.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — *Matériel*

1. 1. — *Appareil de traitement.*

L'appareil utilisé est un « Micronizer » fabriqué par Micronizing Co, FRAMLINSGHAM (Suffolk) Grande-Bretagne, dont le principe de fonctionnement, décrit par PUTNAM (1973), est le suivant (fig. 1) :

— le maïs, contenu dans une trémie d'alimentation (1) est réparti par un vibreur électrique (2) sur un tapis métallique (3) en une couche mono-grain, et soumis à l'action brève d'un rayonnement infrarouge produit par des céramiques (4) chauffées au gaz propane. Il est ensuite immédiatement aplati entre deux cylindres cannelés (∅ 45,7 cm) (5), puis refroidi par air forcé dans un

cyclone (6) avant d'être ensaché (9). Ce maïs ainsi infranisé se présente sous forme d'un mélange très hétérogène de grains aplatis ou flocons et de particules plus fines.

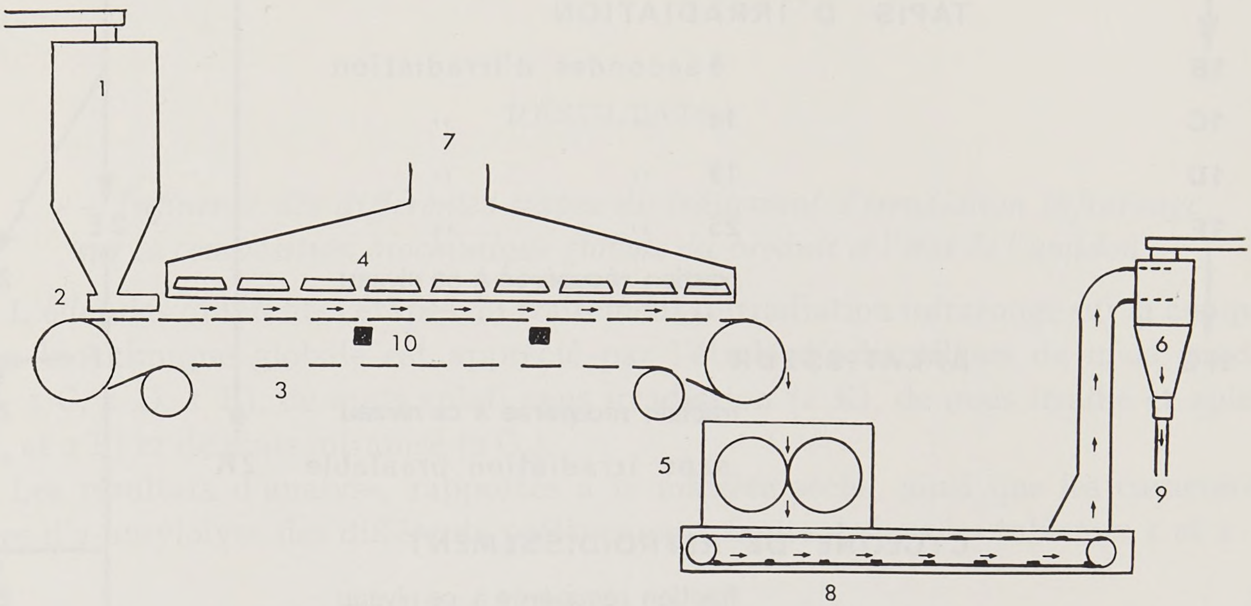


FIG. 1. — *Schéma de l'appareil d'irradiation infrarouge*

1 - Trémie d'alimentation
2 - Vibreur de distribution
3 - Tapis métallique
4 - Céramiques de chauffage
5 - Aplatisseur
6 - Cyclone de refroidissement
7 - Hotte d'aspiration des gaz brûlés
8 - Transporteur à chaîne
9 - Bouche d'ensachage
10 - Vibreur de changement de position des grains.

L'intensité du traitement peut être réglée en intervenant sur divers paramètres ; les valeurs choisies pour ceux-ci correspondent à celles habituellement retenues pour cette installation :

— la proportion du comburant, réglée par une vanne d'admission d'air, est approximativement de 96 p. 100 d'air et 4 p. 100 de propane;

— la durée d'irradiation, régie par la vitesse d'avancement du tapis métallique, est de 25 secondes;

— l'écartement des cylindres aplatisseurs est de 1 mm.

Des pertes de matières sont observées en plusieurs points :

— sous le tapis métallique, au niveau du vibreur, dont le rôle est de modifier l'exposition des grains de maïs au rayonnement infrarouge;

— à la sortie de la cage de l'aplatisseur;

— au niveau du cyclone de refroidissement.

1. 2. — *Préparation des échantillons de maïs.*

Deux essais ont été effectués; le premier avec un lot de maïs-grain commercial, non homogénéisé, ayant une teneur en eau de 16 p. 100, le second avec un lot de maïs-grain commercial à hydratation de 13 p. 100, préalablement homogénéisé dans une mélangeuse horizontale, pendant 4 minutes.

Les divers prélèvements effectués au cours du traitement sont décrits dans la figure 2; le maïs prélevé à la sortie de l'aplatisseur (1 F_0) a été fractionné, par tamisage, en flocons (1 F_1) et particules fines (1 F_2) de taille inférieure à 3,15 mm. Quatre échantillons ont été prélevés dans un sac de maïs considéré commercialisable (ou infranisé) (2 G_0) : deux fractions (2 G_1) et (2 G_2) de particules de tailles respectivement inférieures à 2,0 mm et à 3,15 mm prélevées dans la partie supérieure du sac, une fraction (2 G_3) de particules de tailles inférieures à 3,15 mm prélevées dans la partie inférieure du sac et une fraction (2 G_4) de flocons.

Sur tous les échantillons prélevés avant l'aplatissage, la répartition entre grains entiers, demi-cassés et brisures ainsi que le poids de 1 000 grains ont été déterminés.

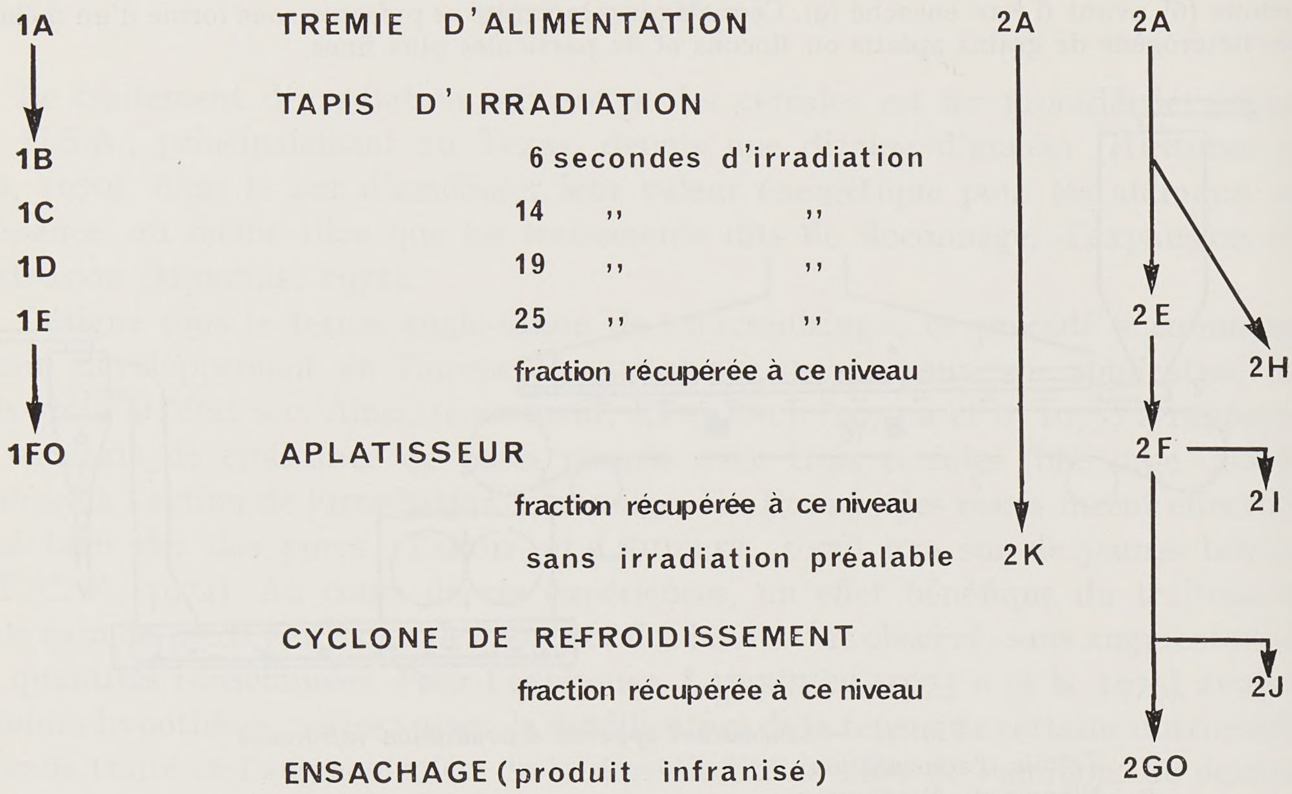


FIG. 2. — *Prélèvements des échantillons à différents niveaux de l'appareil d'irradiation infrarouge*

Sur tous les échantillons prélevés après l'aplatissage, les particules sont séparées en différentes classes (tailles supérieures à 2 mm, comprises entre 1 et 2 mm, comprises entre 1 et 0,5 mm et inférieures à 0,5 mm).

Les différents échantillons (25 g) ainsi prélevés ont été broyés à l'aide d'un broyeur IKA type A-10, refroidi par un courant d'eau, dans les conditions suivantes :

— d'une part, pendant 30 secondes pour la préparation d'une mouture grossière utilisée pour le test de digestibilité *in vitro* de l'amidon ;

— d'autre part, pendant 3 minutes pour la préparation d'une mouture dont la taille des particules est inférieure à 0,5 mm pour les analyses biochimiques.

2. — *Méthodes d'analyse*

2. 1. *Composition biochimique globale.*

La teneur en eau des produits broyés est déterminée selon la norme française NF V03-602, suivant laquelle le produit broyé est séché durant deux heures à 130°C. Les matières minérales et les protéines sont dosées selon les méthodes officielles du C. N. E. R. N. A. (1958), les lipides totaux selon la technique de DRAPRON (1975), l'ensemble « cellulose et lignine » selon la méthode de l'insoluble formique de GUILLEMET et PRECEPTIS (1945) modifiée par TOLLIER (1976, communication personnelle), l'amidon selon la méthode enzymatique de THIVEND, MERCIER et GUILBOT 1972) et les pentosanes selon la technique de CERNING et GUILBOT (1973).

2. 2. *Extraction, fractionnement et dosage des glucides solubles.*

2. 21. *Fraction éthanolo-soluble à 80°GL.*

La fraction éthanolo-soluble à *80*°GL a été dosée selon la méthode décrite par DELORT-LAVAL et MERCIER (1976).

2. 22. *Fraction hydrosoluble.*

Après l'extraction alcoolique, le résidu est remis en suspension dans 30 ml d'eau distillée et centrifugé. Le nombre d'extractions dépend de la quantité de glucides solubles présents, dosés par voie enzymatique (THIVEND, MERCIER et GUILBOT, 1972).

2. 3. *Test de digestibilité in vitro de l'amidon.*

La sensibilité à l'hydrolyse par l'α-amylase de *Bacillus subtilis* de l'amidon des produits témoins et traités, est appréciée selon la méthode décrite par TOLLIER et GUILBOT (1971). Vi, correspondant à la quantité d'amidon hydrolysé pendant les cinq premières minutes (exprimée

en grammes pour cent d'amidon), représente la vitesse initiale d'α-amylolyse; F, calculée par extrapolation au temps zéro de la partie linéaire terminale de la courbe d'α-amylolyse correspond à la fraction d'amidon facilement hydrolysable.

RÉSULTATS

1. — *Influence des différentes étapes du traitement d'irradiation infrarouge sur la composition biochimique globale du produit et l'état de l'amidon*

L'effet des différentes étapes du traitement d'irradiation infrarouge sur la composition biochimique globale est apprécié par l'étude d'échantillons de maïs irradié (1 B, 1 C, 1 D, 1 E), de maïs aplati sans irradiation (2 K), de maïs irradié et aplati (1 F_0 et 2 F) et de maïs infranisé (2 G_0).

Les résultats d'analyse, rapportés à la matière sèche, ainsi que les caractéristiques d'α-amylolyse des différents prélèvements figurent dans les tableaux 1 et 2.

1. 1. — *Effets de l'irradiation infrarouge*

L'irradiation du maïs-grain entraîne une perte d'eau de l'ordre de 10 p. 100 de sa teneur initiale (1 A et 1 B, 1 C, 1 D, 1 E : tabl. 1; 2 A et 2 E : tabl. 2).

Cette déshydratation est une conséquence d'une élévation de la température des grains; cette température, mesurée à l'aide d'une sonde à thermistance sur des échantillons de maïs prélevés à l'extrémité du tapis d'irradiation (1 E, 2 E) et placés immédiatement dans un vase Dewar, est en effet de l'ordre de 113-118°C.

L'irradiation ne semble pas affecter l'intégrité morphologique du grain de maïs, la proportion de grains cassés et de brisures n'augmentant pas durant l'irradiation pour les deux lots de maïs (tabl. 3). Le poids de 1 000 grains (tabl. 3) diminue au moins de 2 p. 100, ce qui est en accord avec la diminution de la teneur en eau au cours du traitement.

En tenant compte des erreurs expérimentales, il apparaît que l'irradiation ne modifie pas la composition globale des maïs. Les teneurs en lipides, protéines (N × 5,7) et matières minérales ne sont pas différentes. Aucune différence notable ne peut être observée, pour les deux lots de maïs étudiés, sur les teneurs en pentosanes et amidon des maïs irradiés ainsi que sur les fractions glucides éthanolosolubles et hydrosolubles.

L'augmentation de la sensibilité à l'α-amylolyse indique un endommagement des grains d'amidon des maïs irradiés. La vitesse initiale d'hydrolyse et la fraction facilement attaquable augmentent avec le temps d'irradiation (tabl. 1, 1 A à 1 E). Ainsi après 25 secondes d'irradiation, ces valeurs se trouvent multipliées par un facteur de 1,5. Cette différence de sensibilité, observée entre le lot 2 et le lot 1, pourrait être due à la différence de teneurs en eau qu'ils présentent respectivement : 13 et 16 p. 100.

1. 2. — *Effets de l'aplatissage*

L'influence du seul traitement d'aplatissage, sans irradiation préalable, est examinée sur le lot de maïs 2 (2 A et 2 K) et les résultats sont rapportés dans le tableau 2.

TABLEAU I

Composition globale et caractéristiques d'α-amylolyse des échantillons de maïs du lot 1

Échantillons	Teneur en eau en p. 100 du produit	Résultats p. 100 de la matière sèche								Caractéristiques d'α-amylolyse p. 100 d'amidon	
		Protéines N × 5,7	Lipides	Matières minérales	Pentosanes	Insoluble formique	Amidon	Fraction ethanolosoluble 80 °GL	Fraction hydrosoluble	Vi	F
Maïs initial 1 A	16,1	10,6	4,7	1,6	2,9	4,8	71,7	2,2	0,5	3,0	8,0
Maïs irradié 1 B	15,5	10,9	5,2	1,7	2,9	4,5	71,4	2,0	0,5	3,5	8,5
Maïs irradié 1 C	15,1	10,7	5,1	1,5	2,8	4,9	69,1	2,2	0,7	3,0	11,5
Maïs irradié 1 D	14,9	10,8	4,8	1,5	2,8	4,4	70,0	2,3	0,7	5,0	12,0
Maïs irradié 1 E	14,6	10,1	5,1	1,6	2,9	5,0	69,1	2,4	0,7	5,5	13,0
Maïs irradié et aplati 1 F_0 :											
– Flocons 1 F_1	12,5	10,5	2,3	0,6	1,3	3,1	80,3	1,6	1,6	19,0	49,0
– Particules fines 1 F_2	10,1	10,9	4,7	5,1	7,2	21,7	29,1	5,6	0,3	10,5	40,3

TABLEAU 2

Composition globale et caractéristiques d'α-amylolyse des échantillons de maïs du lot 2

Échantillons	Teneur en eau en p. 100 du produit	Résultats p. 100 de la matière sèche								Caractéristiques α-d'amylolyse p. 100 d'amidon	
		Protéines N × 5,7	Lipides	Matières minérales	Pentosanes	Insoluble formique	Amidon	Fraction éthanolosoluble 80°GL	Fraction hydrosoluble	Vi	F
Maïs initial 2 A	13,0	9,7	5,4	1,54	7,0	3,7	68,1	2,0	1,5	1,5	11,0
Maïs irradié 2 E	11,8	9,7	5,5	1,43	6,1	3,2	68,2	1,9	1,6	1,7	11,6
Maïs aplati 2 K	12,4	10,1	4,8	1,34	6,0	4,3	69,5	2,1	1,3	8,5	24,4
Maïs irradié et aplati 2 F	10,2	9,7	5,3	1,27	7,3	4,0	68,8	1,9	2,3	17,5	71,9
Maïs infranisé 2 G_0	10,1	10,0	4,9	1,19	7,1	2,6	71,1	1,5	2,4	15,5	54,9
– Fraction 2 G_1	8,7	10,1	12,9	3,9	6,3	17,9	40,8	3,7	0,4	5,5	12,3
– Fraction 2 G_2	9,0	10,4	11,6	3,2	6,3	15,0	47,3	3,7	0,5	5,5	44,9
– Fraction 2 G_3	9,4	10,3	12,5	3,2	5,5	16,7	47,7	3,5	1,0	5,5	44,3
– Flocons 2 G_4	10,5	10,1	3,8	0,9	5,2	1,0	78,7	1,4	2,6	17,5	85,6
Fractions récupérées 2 I au niveau de l'aplatisseur	9,1	8,6	7,4	2,2	5,0	5,9	62,5	2,4	0,5	1,5	11,1
Fractions récupérées 2 J au niveau du cyclone	8,0	7,4	9,2	2,2	16,5	6,6	52,7	2,5	0,2	2,5	20,3

TABLEAU 3

Influence de l'irradiation infrarouge sur le poids de 1 000 grains et leur intégrité morphologique

Échantillons de maïs	Lot 1					Lot 2	
	Initial	En cours d'irradiation			Irradié	Initial	Irradié
	1 A	1 B	1 C	1 D	1 E	2 A	2 E
Répartition en p. 100 :							
– Grains entiers	93,8	92,6	96,2	95,5	94,4	85,0	87,0
– Grains demi-cassés						5,0	3,0
– Brisures	6,2	7,4	3,8	4,5	5,6	10,0	10,0
Poids de 1 000 grains secs en grammes ...	289	288	286	291	280	240	230

Le maïs aplati se présente sous la forme d'un produit hétérogène comportant une importante fraction de flocons (50 p. 100) de taille de l'ordre de 5 mm, un faible pourcentage (5 p. 100) de grains intacts et une fraction (45 p. 100) de particules fines (fig. 3).

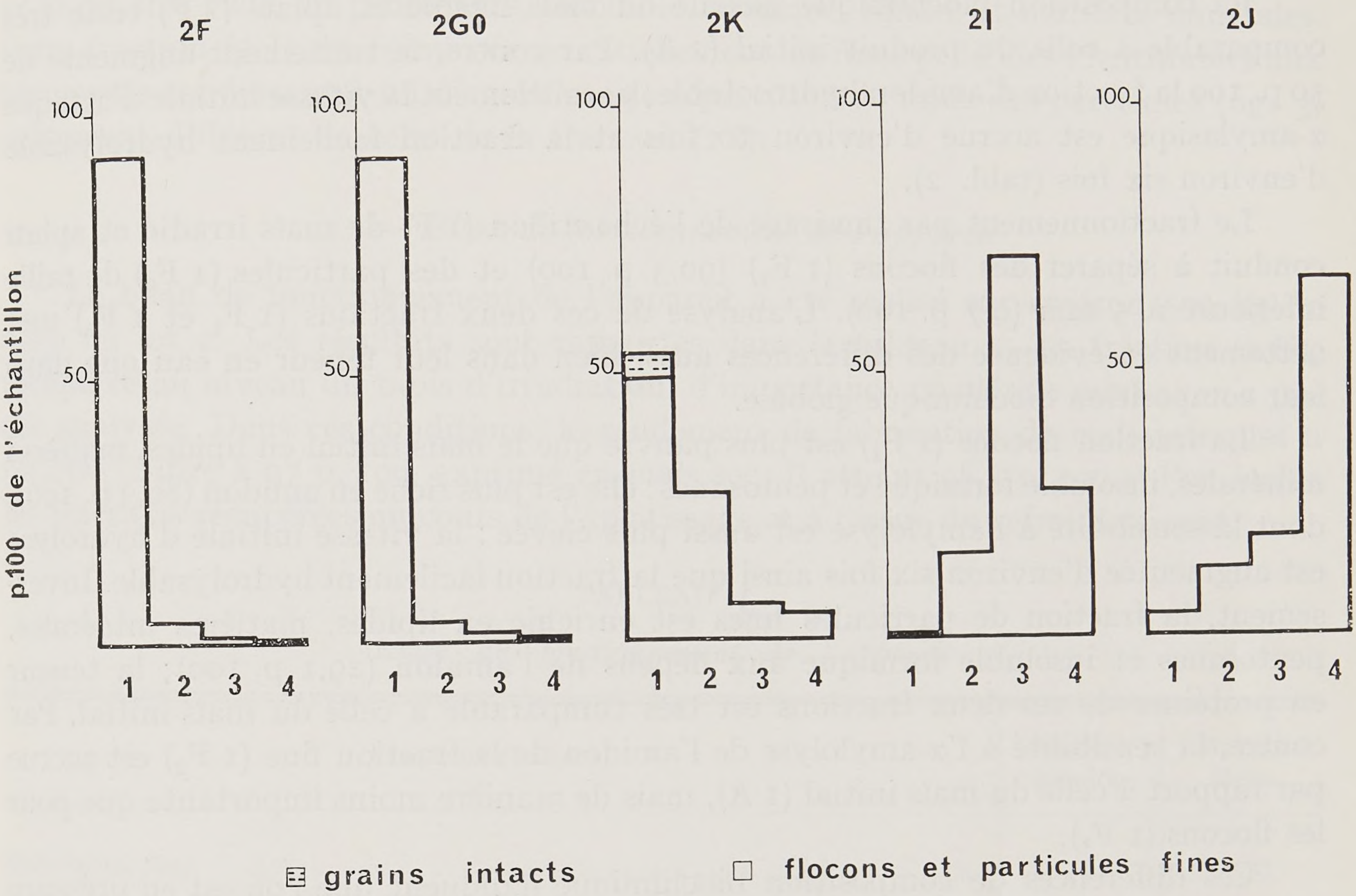


FIG. 3. — *Diagrammes de répartition de taille des particules*

2 F : Maïs irradié et aplati
2 G_0 : Maïs infranisé
2 K : Maïs aplati sans irradiation préalable
2 I : Fraction récupérée au niveau de l'aplatisseur
2 J : Fraction récupérée au niveau du cyclone de refroidissement

1 - Taille supérieure à 2 mm
2 - Taille comprise entre 1 et 2 mm
3 - Taille comprise entre 0,5 et 1 mm
4 - Taille inférieure à 0,5 mm

Les teneurs en protéines, lipides, matières minérales, pentosanes, insoluble formique et amidon du maïs initial (2 A) et du maïs aplati (2 K) restent du même ordre de grandeur. Le seul aplatissage, dans les conditions de l'expérience, ne permet pas d'accroître la solubilité dans l'eau de l'amidon. Par contre, la sensibilité à l'α-amylase de ce dernier est plus importante que celle résultant de l'irradiation. La vitesse initiale d'α-amylolyse est multipliée par un facteur de 5 et la fraction facilement hydrolysable par un facteur de 2.

I. 3. — *Effets conjugués de l'irradiation et de l'aplatissage*

L'influence de l'irradiation suivie de l'aplatissage est étudiée sur deux lots de maïs (1 F_1, 1 F_2, 2 F). Ce traitement conduit à un produit hétérogène (2 F) formé de flocons (92 p. 100) et de particules fines (8 p. 100) dont la répartition en dimensions

des particules diffère très sensiblement de celle résultant de l'aplatissage seul, comme le montrent les diagrammes granulométriques (fig. 3).

L'aplatissage, suivant immédiatement l'irradiation (2 F), provoque une déshydratation de l'ordre de 15 p. 100 par rapport à la teneur en eau du maïs irradié (2 E).

La composition biochimique globale du maïs irradié et aplati (2 F) reste très comparable à celle du produit initial (2 A). Par contre, le traitement augmente de 50 p. 100 la fraction d'amidon hydrosoluble; parallèlement la vitesse initiale d'attaque α-amylasique est accrue d'environ 10 fois et la fraction facilement hydrolysable d'environ six fois (tabl. 2).

Le fractionnement par tamisage de l'échantillon (1 F) de maïs irradié et aplati conduit à séparer des flocons (1 F_1) (90,3 p. 100) et des particules (1 F_2) de taille inférieure à 5 mm (9,7 p. 100). L'analyse de ces deux fractions (1 F_1 et 1 F_2) met nettement en évidence des différences aussi bien dans leur teneur en eau que dans leur composition biochimique globale.

La fraction flocons (1 F_1) est plus pauvre que le maïs initial en lipides, matières minérales, insoluble formique et pentosanes; elle est plus riche en amidon (80,3 p. 100), dont la sensibilité à l'amylolyse est aussi plus élevée : la vitesse initiale d'hydrolyse est augmentée d'environ six fois ainsi que la fraction facilement hydrolysable. Inversement, la fraction de particules fines est enrichie en lipides, matières minérales, pentosanes et insoluble formique aux dépens de l'amidon (29,1 p. 100); la teneur en protéines de ces deux fractions est très comparable à celle du maïs initial. Par contre, la sensibilité à l'α-amylolyse de l'amidon de la fraction fine (1 F_2) est accrue par rapport à celle du maïs initial (1 A), mais de manière moins importante que pour les flocons (1 F_1).

Ces différences de composition biochimique indiquent que l'on est en présence de fractions de maïs n'ayant pas la même origine anatomique.

1. 4. — *Effets du traitement complet du maïs*

Le produit infranisé (2 G_0) présente la même hétérogénéité macroscopique (fig. 3) que le produit prélevé avant le cyclone de refroidissement (2 F). Sa composition globale est différente de celle du maïs irradié et aplati (2 F); moins riche en lipides, matières minérales, insoluble formique et pentosanes, sa teneur en amidon augmente corrélativement. Ce dernier résultat corrobore ce qui a été observé sur le lot (1 F). Les caractéristiques d'α-amylolyse des lots (2 G_0 et 2 F) sont par contre très voisines.

Pour confirmer la variation de composition biochimique selon la dimension des particules constitutives, le lot de maïs infranisé (2 G_0) a été fractionné par taille de particules et les différentes fractions (2 G_1, 2 G_2, 2 G_3, 2 G_4) sont analysées comme précédemment (tabl. 2). Par rapport au produit initial, la fraction flocons (2 G_4) est très riche en amidon hydrolysable et appauvrie en lipides, matières minérales, pentosanes et insoluble formique. Au contraire, les fractions de particules (2 G_1, 2 G_2, 2 G_3) ont toutes une teneur plus faible en amidon moins facilement hydrolysable que celui de la fraction flocons (2 G_4). Parallèlement, elles sont toutes plus riches en matières minérales, pentosanes, insoluble formique et lipides que les flocons (2 G_4).

La fraction récupérée au niveau de l'aplatissage (2 I) s'avère très enrichie en matières minérales et lipides et appauvrie en pentosanes et insoluble formique par rapport au maïs initial. L'examen du diagramme granulométrique (fig. 3) montre la présence de petits fragments de maïs. La fraction récupérée après le cyclone (2 J) est très riche en pentosanes, insoluble formique, lipides et matières minérales. Cette fraction (2 J) est composée essentiellement de fines pellicules identifiables aux téguments conduisant à un diagramme de répartition de taille des particules (fig. 3) nettement différent de celui de la fraction (2 I).

2. — *Bilan de fonctionnement de l'appareil*

Le bilan de fonctionnement de l'appareil a été réalisé sur environ 500 kg de maïs du lot 2. Les résultats sont rapportés dans le tableau 4. La fraction (2 H), récupérée au niveau du tapis d'irradiation, d'importance pondérale minime, n'a pas été analysée. Dans ces conditions, le rendement de fabrication de maïs infranisé a pu être chiffré à 97 p. 100, exprimé en maïs sec; il atteint 98,4 p. 100 si l'on inclut les fractions récupérées au cours de l'aplatissage et à l'issue du refroidissement.

TABLEAU 4

Bilan du fonctionnement de l'appareil

Fractions étudiées	Matière humide	Matière sèche
Maïs initial (kg) 2 A	502	437
Produit infranisé (kg) $2\ G_0$	473	425
Fractions récupérées au niveau du tapis d'irradiation (kg) 2 H	0,5	—
Fractions récupérées au niveau de l'aplatisseur (kg) 2 I	2,5	2,3
Fractions récupérées au niveau du cyclone (kg) 2 J	3,0	2,8
Total des fractions récupérées (kg) $2\ H + 2\ I + 2\ J$	6,0	5,1
Total récupéré (kg) $2\ G_0 + 2\ H + 2\ I + 2\ J$	479,0	430,1
Bilan global de récupération (kg) $(2\ G_0 + 2\ H + 2\ I + 2\ J) - 2\ A$	— 23,0	— 6,9
Rendement de récupération × 100 $\frac{2\ G_0 + 2\ H + 2\ I + 2\ J}{2\ A} \times 100$	95,6	98,4
Rendement de fabrication × 100 $\frac{2\ G_0}{2\ A} \times 100$	94,0	97,0
Taux des fractions récupérées p. 100/maïs initial $\frac{2\ H + 2\ I + 2\ J}{2\ A} \times 100$.	1,2	1,2

Dans le travail industriel, ces fractions sont normalement rajoutées au « maïs infranisé » destiné à la commercialisation sans qu'il y ait homogénéisation de l'ensemble.

La freinte totale sur le produit brut est de 23 kg, soit 4,4 p. 100 du poids initial. Exprimée en matière sèche, elle n'est plus que de 2 p. 100. Qu'elles soient exprimées en matière sèche ou humide, les fractions récupérées aux divers stades du traitement (2 H, 2 I, 2 J) représentent de l'ordre de 1 p. 100 de la masse traitée.

Le calcul du bilan analytique des constituants du maïs, c'est-à-dire amidon,

protéines, lipides et glucides de structure (pentosanes, cellulose) et lignine (tabl. 5), à l'aide des tableaux 2 et 4, montre un excès d'amidon et de protéines et une diminution des lipides et des glucides de structure. Ces écarts peuvent s'expliquer soit par une perte réelle qui ne fut pas remarquée au niveau de l'installation lors de nos essais, soit par l'accumulation des erreurs expérimentales. Les fractions récupérées aux divers stades du traitement représentent 1 à 2 p. 100 de l'amidon, des protéines, des lipides et glucides de structure initialement présents dans le grain.

DISCUSSION

Cette étude concerne l'influence des différentes étapes de l'irradiation infrarouge — irradiation infrarouge proprement dite et aplatissage — sur la composition biochimique globale et l'état de l'amidon de maïs-grain à des teneurs en eau de 13 et 16 p. 100. Il en ressort les points essentiels suivants :

— la seule irradiation infrarouge réduit la teneur en eau du maïs-grain d'environ 10 p. 100 sans qu'aucune modification importante de la composition biochimique globale soit observée. La température du grain peut atteindre 120°C, entraînant une modification des grains d'amidon : cette dernière se traduit en particulier par la nette amélioration de sa sensibilité à l'α-amylase, comme il a déjà été observé par MERCIER et GUILBOT (1974) au cours du prétraitement à la vapeur de maïs concassé avant d'être granulé ;

— l'aplatissage seul pour l'échantillon de maïs hydraté à 13 p. 100 abaisse sa teneur en eau à un moindre degré que l'irradiation infrarouge et conduit à un produit comprenant un ensemble de petits flocons mélangés à une poudre. Il augmente la digestibilité *in vitro* de l'amidon ; cet effet est à rapprocher de celui d'une pression appliquée au grain d'amidon (MERCIER, CHARBONNIÈRE et GUILBOT, 1968) ;

— les actions successives de l'irradiation infrarouge et de l'aplatissage aboutissent à un produit constitué principalement de flocons (1 F_1, 2 G_4) (de l'ordre de 90 p. 100) et de particules (1 F_2, 2 G_1, 2 G_2, 2 G_3) de taille inférieure à 5 mm. Ces deux types de fractions présentent des compositions biochimiques très sensiblement différentes. En effet, par rapport au maïs initial, la fraction de type flocons est appauvrie en lipides, matières minérales, glucides de structure (pentosanes et cellulose) et lignine, et par voie de conséquence enrichie en amidon (80 p. 100). Par contre, la fraction de particules fines est enrichie en lipides, matières minérales, glucides de structure et lignine aux dépens de l'amidon. Pour ces deux fractions, la sensibilité à l'α-amylase est augmentée d'un facteur supérieur à celui obtenu par la simple addition des effets des deux traitements. L'amidon, lésé par l'irradiation infrarouge, est en effet immédiatement soumis à l'aplatissage alors que les grains de maïs sont encore à une température de 115°C. Ces dernières observations viennent confirmer et préciser les remarques de LAWRENCE (1973 a et b, 1975).

On sait à partir des analyses des différentes parties anatomiques du grain de maïs (EARLE, CURTISS et HUBBARD, 1946) que les lipides, les matières minérales, les protéines, les glucides éthanolosolubles sont surtout concentrés dans l'embryon, les glucides de structure et la lignine dans les téguments et que l'amidon est le constituant essentiel de l'albumen. Durant l'aplatissage suivi du refroidissement au cyclone, il y a un fractionnement du maïs : la fraction flocons (2 G_4), très riche

TABLEAU 5

Bilan analytique des constituants du maïs au cours des différentes étapes du traitement

Fractions étudiées	Amidon	Protéines N × 5,7	Lipides	Glucides de structure + Lignine
Maïs initial (kg) 2 A	297,3	42,5	23,6	46,7
Maïs infranisé (kg) $2\ G_0$	301,9	42,6	20,7	41,5
Fractions récupérées au niveau de l'aplatisseur (kg) 2 I	1,4	0,2	0,2	0,3
Fractions récupérées au niveau du cyclone (kg) 2 J	1,4	0,2	0,3	0,7
Total des fractions récupérées (kg) 2 I + 2 J	2,8	0,4	0,5	1,0
Total récupéré (kg) $2\ G_0 + 2\ I + 2\ J$	304,7	43,0	21,2	42,5
Bilan global de récupération (kg) $(2\ G_0 + 2\ I + 2\ J) - 2\ A$	+ 7,4	+ 0,5	— 2,4	— 4,2
Rendement de récupération × 100 $\frac{2\ G_0 + 2\ I + 2\ J}{2\ A} \times 100$	102,4	101,2	89,0	91,0
Rendement de fabrication × 100 $\frac{2\ G_0}{2\ A} \times 100$	101,0	100,0	87,0	89,0
Taux des fractions récupérées p. 100/maïs initial $\frac{2\ I + 2\ J}{2\ A} \times 100$	1,0	0,9	2,1	2,1
Taux des fractions récupérées p. 100/maïs infranisé $\frac{2\ I + 2\ J}{2\ G_0} \times 100$	0,9	0,9	2,4	2,4

en amidon, est constituée surtout de l'albumen des grains et la composition des fractions fines (2 G_1, 2 G_2, 2 G_3) est nettement influencée par celles des téguments et du germe (teneurs plus importantes en lipides, minéraux, glucides éthanolosolubles et de structure).

LAWRENCE (1973 a) avait déjà observé, dans le produit résultant du traitement d'irradiation infrarouge, une diminution de la teneur en certains constituants qu'il avait attribuée à un dégermage partiel. Les essais que nous avons réalisés révèlent en fait une élimination partielle du germe et des téguments, ainsi qu'en témoignent les analyses des fractions récupérées respectivement au niveau de l'aplatisseur (2 I) et du cyclone (2 J).

Ainsi, sous sa forme commerciale actuelle, le maïs infranisé est constitué de particules de taille et de composition différentes. Il en résulte, au cours de la conservation ou des transports, un filtrage des petits éléments à travers les espaces séparant les gros. Ce phénomène de ségrégation, de déshomogénéisation progressive conduit à des fractions grossière et fine de valeur nutritionnelle différente. Ce fait permet de mieux comprendre l'accroissement apparent de la teneur en amidon dans ce produit, en raison des grandes difficultés à réaliser un prélèvement représentatif de l'ensemble. Il peut en être de même au cours de la consommation du produit, au moins pour un certain mode de présentation, ce qui risque de majorer l'appréciation de la valeur énergétique du maïs infranisé. Il n'en reste pas moins que la digestibilité *in vitro* de l'amidon est nettement améliorée par le traitement d'irradiation infrarouge; cependant il conviendrait, de vérifier que cette amélioration est supérieure à celle provoquée par le simple traitement de granulation à la vapeur.

Dans la présente étude, l'irradiation infrarouge a été appliquée à du maïs-grain à 15 p. 100 d'humidité. On peut se demander si ce taux est réellement un optimum, ou si au contraire une réhumidification serait utile. D'autre part, le rôle de la répartition de l'eau à l'intérieur du grain mériterait d'être précisé : une combinaison du séchage du maïs-grain récolté humide avec le traitement hydrothermique d'irradiation infrarouge, en modifiant éventuellement les conditions de travail, pourrait être doublement avantageuse; elle pourrait être appliquée lors du deuxième temps du séchage du maïs après sa récolte.

Reçu pour publication en novembre 1976.

REMERCIEMENTS

Nous remercions la Coopérative AGRI-CHER (route de la Charité, B. P. 104, 18002 Bourges), et en particulier MM. LELOUP et ZELLER, qui ont bien voulu mettre leur installation de la Chapelle-Montlinard à notre disposition pour ces essais.

SUMMARY

INFLUENCE OF THE MICRONIZATION PROCESS ON THE COMPOSITION AND FRAGMENTATION OF MAIZE KERNEL AND THE STRUCTURE OF MAIZE STARCH

The influence of the different steps during the micronization process of maize — infra-red irradiation, flaking and cyclone cooling — on the composition and fragmentation of the kernel and the structure of the starch has been studied.

The yield of the industrial process, carried out on 500 kg of maize, was 97.0 p. 100 based on dry micronized maize and 98.4 p. 100 including the different losses during the process.

The infra-red irradiation and flaking steps separately did not modify the composition of maize. The irradiation step slightly improved starch availability as compared with the effect of the flaking step.

The combination of infra-red irradiation and flaking led to a heterogeneous product with flakes (90 p. 100) and fine particles (10 p. 100). However the distribution between these two fractions was different after the flaking step alone.

A comparison of the composition of these fractions showed that flakes, with a higher percentage of starch and a lower percentage content of cell-wall carbohydrates, lipids and ashes than untreated maize corresponded mainly to the maize endosperm whereas the composition of the fine particles was similar to that of the teguments and germ. *In vitro* starch availability was improved by infra-red irradiation and flaking. Furthermore, starch from flakes was much more susceptible to enzymes than starch from fine particles.

Based on these results, it would appear that a further grinding of the micronized product would make it more homogeneous and similar in composition to the unprocessed grain. In any case the *in vitro* digestibility of starch is always increased by the process. Without further grinding, the micronized product is not homogeneous and thus could have a variable energetic value, as a feed, due to the differences in the composition and availability of the starch in the two fractions, flakes and fine particles.

RESUMEN

INFLUENCIA DE LA IRRADIACION INFRARROJA Y DEL APLASTAMIENTO EN LA FRAGMENTACION, LA COMPOSICION Y EL ESTADO DEL ALMIDON EN EL MAIZ EN GRANO

Se ha examinado la influencia de las distintas etapas del tratamiento de irradiacion mediante infrarrojos del maiz en grano — irradiacion mediante infrarrojos propiamente dicha, aplastamiento y enfriamiento mediante ciclon — en la composicion bioquimica global del maiz cuya proporcion de agua esta comprendida entre 13 y 16 %. Igualmente ha sido examinado el estado de su almidon.

El balance del funcionamiento del aparato, efectuado con 500 kg de maiz, ha sido del 97,0 % respecto al maiz infranizado seco y el rendimiento de recuperacion total de la materia seca del 98,4 %.

La irradiacion infrarroja sola, asi como el aplastamiento sin irradiacion previa no modifica la composicion bioquimica del maiz. En cambio, ambos procesos aumentan la sensibilidad de los productos al α-amilolisis por deterioro de los granos de almidon.

El efecto de las aplicaciones sucesivas de la irradiacion infrarroja y del aplastamiento conduce a la obtencion de un producto de particulas de dimensiones muy heterogéneas formado aproximadamente por un 90 % de copos y un 10 % de particulas finas. El estudio de su composicion ha revelado que los copos, enriquecidos en almidon y empobrecidos en glucidos de estructura, lipidos y materias minerales, corresponden esencialmente a fracciones del albumen del maiz, mientras que las particulas finas son mas ricas en fracciones de tegumento y en germen.

En el caso de que el producto comercializado sea homogeneizado mediante una trituracion posterior, el tratamiento de irradiacion mediante infrarrojos no tiene efectos sobre la composicion bioquimica del producto. Sin embargo, en todos los casos valoriza la digestibilidad del almidon *in vitro*. La facil segregacion del producto infranizado en particulas finas y en copos conduce a un elemento de un valor energético variable a causa de la composicion quimica diferente de estas dos fracciones. Se puede pensar que este fenomeno ha podido falsear los resultados del ensayo *in vivo*.

RIASSUNTO

INFLUENZA DELL'IRRAGGIAMENTO INFRAROSSO E DELLO SCHIACCIAMENTO SULLA FRAMMENTAZIONE, SULLA COMPOSIZIONE DEL GRANTURCO GRANELLA E SULLO STATO DEL SUO AMIDO

Lo studio in questione concerne l'influenza delle diverse tappe del trattamento d'irraggiamento infrarosso del granturcogranella — irraggiamento infrarosso propriamente detto,

schiacciamento e raffreddamento mediante ciclone — sulla composizione biochimica globale del granturco con tenore d'acqua compreso tra 13 e 16 p. 100 e lo stato del loro amido.

Il bilancio di funzionamento dell'apparecchio effettuato su 500 kg di granturco, è stato di 97,0 p. 100 rispetto al granturco irradiato essiccato e il rendimento di ricupero totale della materia secca di 98,4 p. 100.

Il solo irraggiamento infrarosso, come pure lo schiacciamento senza irraggiamento preliminare, non modifica la composizione biochimica del granturco. I due trattamenti aumentano invece la sensibilità dei prodotti all' α-amilolisi danneggiando i grani d'amido.

Le applicazioni successive dell'irraggiamento infrarosso e dello schiacciamento si traducono in un prodotto con particelle aventi delle dimensioni molto eterogene formate da circa 90 p. 100 di fiocchi e di circa 10 p. 100 di particelle fini. Lo studio della loro composizione ha rivelato che - fiocchi, ricchi in amido e poveri in glucidi di struttura, lipidi e materie minerali, corrispondono essenzialmente a delle frazioni dell'albume del granturco mentre le particelle fini sono più ricche in frazioni di tegumento e di germe.

Nel caso in cui il prodotto messo in commercio è omogeneizzato tramite una ulteriore macinatura, il trattamento d'irraggiamento infrarosso non ha alcun effetto sulla composizione biochimica del prodotto. Esso valorizza invece sempre la digeribilità dell'amido *in vitro*. La facilissima segregazione del prodotto irradiato in particelle fini e in fiocchi dà un alimento il cui valore energetico è variabile a causa della differenza della composizione chimica di queste due frazioni. E' probabile che questo fenomeno abbia potuto falsare i risultati di prova *in vivo*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CERNING J., GUILBOT A., 1973. A specific method for the determination of pentosans in cereals and cereal products. *Cereal Chem.*, **50**, 176-184.

C. N. E. R. N. A., 1958. Les cahiers techniques du C. N. E. R. N. A., n° III. Les méthodes analytiques des céréales, farines et autres produits dérivés. C. N. R. S., éd. Paris, 159-243.

DELORT-LAVAL J., MERCIER C., 1976. Évaluation de divers traitements technologiques des céréales. 1. — Choix des traitements et étude de leur influence sur la fraction glucidique du blé, de l'orge et du maïs. *Ann. Zootech.*, **25**, 3-12.

DRAPRON R., 1975. Méthode rapide de détermination quantitative des lipides totaux dans les produits céréaliers. *Ann. Technol. Agric.*, **24**, 117-131.

EARLE F. R., CURTIS J. J., HUBBARD J. E., 1946. Composition of the component parts of the corn kernel. *Cereal Chem.*, **23**, 504-511.

GUILLEMET R., PRECEPTIS P., 1945. La détermination de la cellulose par dissolution de l'amidon et des protéines par l'acide formique. *C. R. Acad. Agriculture France*, procès-verbal de la séance du 15 avril, 1-3.

HINDERS R., ENG K., 1970. Effect of grain sorghum type on starch degradation due to pressure cooking and micronizing. *Feedstuffs*, **42**, 20.

I. T. C. F., 1974. Compte rendu d'essai, Boigneville 400. Utilisation du maïs-grain pour la production des jeunes bovins.

LAWRENCE T. L. J., 1973 a. An evaluation of the micronization process for preparing cereals for the growing pigs. I. Effects on digestibility and nitrogen retention. *Anim. Prod.*, **16**, 99-107.

LAWRENCE T. L. J., 1973 b. An evaluation of the micronization process for preparing cereals for the growing pigs. II. Effects on growth rate, food conversion efficiency and carcass characteristics. *Anim. Prod.*, **16**, 109-116.

LAWRENCE T. L. J., 1975. An evaluation of the micronization process for preparing cereals for the growing pigs. III. A note on the effect of micronization temperature on the nutritive value of wheat. *Anim. Prod.*, **20**, 167-170.

LIVINGSTONE H. G., 1973. The Micronizer and Micronized Products, Focus on Feed, june 4-6, London. *Agricultural Industries Training services.*

MERCIER C., CHARBONNIERE R., GUILBOT A., 1968. Influence d'un traitement par pression sur la structure granulaire de différents amidons et sur leur sensibilité aux enzymes. *Die Stärke*, **20**, 6-11.

MERCIER C., 1971. Effects of various U.S. grain processes on the alteration and the *in vitro* digestibility of starch granule. *Feedstuffs*, **43**, 33-36.

MERCIER C., GUILBOT A., 1974. Influence des conditions de granulation du maïs sur les caractéristiques physicochimiques de son amidon. *Ann. Zootech.*, **23**, 241-251.

Norme Française A. F. N. O. R., NF V 03-602. Dosage de l'eau (méthode pratique).

Putnam M., 1973. Micronisation. A new feed processing technique. *Flour and animal Feed Milling*, **155**, 40-41.

Tardif H., Leuillet M., 1976. Effets de la micronisation du maïs ou du blé chez des porcs nourris à volonté. *Journées Rech. Porcine en France*, 17-24, I. T. P. - I. N. R. A. Paris.

Thivend P., Mercier C., Guilbot A., 1972. Determination of starch with gluco-amylase. In Whistler R., Bemiller J. N., Method in carbohydrate chemistry. VI. General carbohydrate method, 100-105. *Academic Press*, New York and London.

Tollier M. T., Guilbot A., 1971. Étude de l'action des amylases α et β sur l'amidon irradié par rayonnement γ. *Ann. Technol. Agric.*, **20**, 61-73.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (4), 309-336.

CARACTÉRISTIQUES BIOCHIMIQUES, QUALITÉ ET APTITUDE A LA CONSERVATION DE MELONS (CANTALOUP CHARENTAIS, cv. DOUBLON) CULTIVÉS SOUS SERRES

R. DUMAS de VAULX *, S. AUBERT **

avec la collaboration technique de D. CHAMBONNET, J. CHARNAY et Irène URSELLA

* *Station d'Amélioration des Plantes maraîchères*

** *Station de Technologie des Produits végétaux*
Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,
84140 Montfavet

RÉSUMÉ

L'évolution de la qualité des fruits du cultivar de Melon « *Doublon* » (type « *Cantaloup Charentais* ») cueillis mûrs a été suivie en cours de conservation à la température ambiante (22-25°C) et au froid (+ 4°C). Cette étude a été réalisée sur deux lots de fruits distincts : l'un provenant d'une culture hivernale sous serre verre chauffée, l'autre d'une culture sous serre tunnel plastique de fin de printemps.

Les indices organoleptiques et alimentaires considérés : densité, forme, calibre, poids de chair consommable, sucres, acides, substances pectiques, caroténoïdes, vitamine C ont été analysés fruit par fruit. On a confronté les valeurs moyennes et les variabilités de lots de 6 fruits.

Le pourcentage de matières sèches solubles mesuré au réfractomètre et la fermeté de la chair mesurée au pénétromètre sont deux critères qui se sont révélés valables pour la sélection variétale et pour faire un tri de fruits acceptables pour le consommateur.

Une réfrigération précoce autour de + 4°C s'est avérée suffisante pour maintenir durant plus d'une semaine une bonne qualité des fruits cueillis à maturité.

INTRODUCTION

La sélection variétale du Melon orientée vers l'amélioration des qualités du fruit, a besoin de définir préalablement les caractéristiques biochimiques ou physiques les plus représentatives d'une meilleure valeur gustative et alimentaire ou d'un intérêt technologique, plus particulièrement de leur aptitude à la conservation en frais et de leur tenue en cours de commercialisation.

Dans le domaine de la recherche, les comparaisons entre variétés, entre récoltes et même entre les fruits d'une même plante s'effectuent généralement sur des fruits cueillis à des dates différentes et quelquefois conservés dans des conditions plus ou moins reproductibles de température et d'atmosphère, dans les meilleurs cas, en

chambre froide régulée. De plus, les conditions de cultures couramment utilisées dans un travail de sélection diffèrent souvent d'une récolte à l'autre. En culture précoce avec des semis de fin d'hiver, une serre chauffée peut s'imposer ; par contre, en fin de printemps, un abri non chauffé est suffisant pour obtenir une récolte satisfaisante.

Sur un plan pratique, la sélection variétale doit s'adapter aussi à des impératifs économiques de production quelquefois opposés : d'une part assurer une qualité optimale sous tous ses aspects : visuel, gustatif et nutritionnel, d'autre part, conserver des conditions admissibles de rentabilité et de commercialisation, par exemple en diminuant les coûts des cultures et les pertes en cours de stockage.

Le but essentiel de notre travail est de contrôler préalablement la variabilité des analyses effectuées sur un même cultivar de Melon placé dans des conditions différentes : d'une part, de culture et d'autre part, de conservation en frais.

Les repères objectifs étudiés seront plus ou moins représentatifs des qualités précédemment envisagées ; nous essaierons d'en dégager les plus intéressants à retenir pour la sélection variétale au niveau de la recherche et sur le plan de la vulgarisation.

Les études déjà réalisées sur la recherche de critères de qualité portent presque exclusivement sur des cultivars de Melons différents du type « *Cantaloup Charentais* » cultivé en France.

On doit citer les travaux de PRATT (1971) qui ont porté sur les caractéristiques biochimiques des fruits des cultivars de type « *Cantaloupe* » et « *Honeydew* » cultivés en Californie. Dans cette mise au point bibliographique très complète, on trouve : la composition et des contrôles de maturité sur différents cultivars, l'identification de leurs enzymes principales, une importante étude de la respiration des fruits et de la production d'éthylène au cours de la maturation. Ce dernier facteur conditionne fortement l'aptitude à la conservation et a fait l'objet de mesures particulières (ZISMAN et TEMKIM-GORODEISKI, 1975). Sur ces mêmes types variétaux américains, DAVIS, BAKER, et WASMIRE (1964) ont montré la variabilité importante de quelques critères usuels de qualité et recherché les relations pouvant exister entre eux. D'après ces auteurs, les grandes différences d'aspect des Melons, de 24 origines différentes en Californie, ne permettent pas d'établir de relations entre la couleur externe et la teneur en substances solubles de la pulpe.

WIERMSA et BUITELAAR (1975) ont effectué une étude semblable sur les cultivars « *Ogen* » et « *Enkele net* ». Enfin, TEMKIM-GORODEISKI, AHARONI et ZISMAN (1975) ont montré que la saison et le mode d'irrigation n'ont pas d'influence sur la maturation des fruits cueillis verts de la variété « *Honeydew Amid* ». Par contre, les fruits cueillis à un stade plus avancé, en conditions de cultures précoces de printemps ou tardives d'automne, présentent une sénescence rapide marquée par un amollissement et une dégradation de la chair par opposition aux Melons cultivés en été.

L'indice réfractométrique, mesuré sur la chair, est un critère de qualité classique. Il exprime le pourcentage de matières sèches solubles.

AULENBACH et WORTHINGTON (1974) ont montré pour cet indice une assez bonne relation, *r* (coefficient de corrélation) proche de 0,8 pour 40 déterminations avec le caractère sucré et, à un nieau inférieur (*r* voisin de 0,5), avec l'acceptabilité par des consommateurs américains.

Toutefois, peu d'études ont été faites en France sur la qualité des cultivars régionaux les plus appréciés. On peut cependant citer les travaux en cours du groupe de travail I. N. V. U. F. L. E. C. - I. N. R. A. - C. T. I. F. L. rapportés par ZUANG (1973 à 1976).

Dans ces recherches, on a vérifié sur des cultivars français répandus (« *Doublon* », « *Védrantais* », « *Gros Pécout* » en particulier) qu'effectivement des teneurs inférieures à 8 p. 100 de matières solubles mesurées sur la pulpe totale du fruit correspondaient à des Melons de qualité médiocre. Dans d'autres expérimentations, on a noté que la zone de chair la plus sucrée est située près des graines et du placenta, avec un indice réfractométrique supérieur à 10 pour les fruits acceptables ou bons.

De plus, on observe une grande variabilité des préférences des dégustateurs, particulièrement dans le cas des fruits surmûris. Un correctif sur l'acidité, effectué avec intérêt dans l'indice de qualité gustative des pommes « Golden » (THIAULT, 1970), n'intervient pas significativement dans les dégustations comparatives que nous avons effectuées sur le Melon. Il s'est avéré nécessaire de trouver un autre indice représentatif d'un état de maturité excessif.

A surmaturité, après conservation prolongée par exemple, la flaveur prend de nouvelles composantes de fruits fermentés ou blets, plus ou moins appréciées selon les consommateurs. Cette évolution du goût et de l'arôme accompagne la dégradation de la consistance de la chair, surtout sensible autour de la loge du placenta et des graines.

La fermeté est un indice physique immédiat connu des consommateurs et estimé par une déformabilité au niveau de l'attache pistillaire; il n'est sensible qu'à un stade de maturité commerciale déjà avancé et ne peut être employé de façon précise et reproductible. Des mesures instrumentales s'imposent en vue de vérifier son importance réelle pour suivre l'évolution de la qualité du Melon après cueillette et pour essayer de prévoir le stade optimum de récolte (AUBERT et DUMAS de VAULX, 1977).

Un des objectifs de notre étude est de vérifier, dans nos conditions de production, s'il existe des relations intéressantes entre l'un de ces deux critères usuels considérés : indice réfractométrique ou fermeté et divers constituants analysés, plus ou moins spécifiques de l'agrément organoleptique et de la valeur nutritionnelle : sucres, acides, vitamine C, caroténoïdes, substances pectiques.

Le cadre restreint de cette étude n'a pas permis d'aborder l'analyse de constituants essentiels de la flaveur, dont les arômes. On renverra à des travaux sur les caractères organoleptiques des Melons à divers stades de maturité (NIP, BURNS et PATERSON, 1968). De même, les composés volatils les plus caractéristiques ont été suivis en fonction des conditions de culture et de stockage (KEMP, KNAVEL et STOLTZ, 1971, 1972, 1974).

I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal et conditions de culture

Deux plantations du même cultivar « *Doublon* » ont été effectuées à deux périodes différentes l'une hivernale, l'autre printanière.

a) *Essai* (S. V.) *en serre verre chauffée.*

— semis : 24/1/75 - Plantation : 26/2/75 - Densité : 2 plants par m²;
— 70 plantes palissées sur une branche sont réparties le long d'une même raie d'arrosage;
— la pollinisation a été effectuée manuellement et on a gardé 3 fruits par plante.

b) *Essai* (T. P.) *en serre tunnel plastique non chauffée.*

— semis : 25/3/75 - Plantation : 19/4/75 - Densité : 2 plants pour 3 m²;
— 48 plantes sont conduites sur deux branches à plat sur paillage plastique;
— pollinisation naturelle par les abeilles, nombreuses à cette époque.

Le critère de récolte utilisé dans les deux essais est le début de déhiscence du pédoncule; ce stade de récolte est assez bien reconnaissable chez le cultivar « *Doublon* ».

Dans le premier cas (S. V.), la récolte unique a été effectuée le 13 mai, soit 40 jours après la pollinisation provoquée et 77 jours après la plantation.

Dans le deuxième essai (T. P.), la récolte a été faite le 25 juin, soit 67 jours après la plantation.

Échantillonnage.

Dans chacune des deux expérimentations, tous les fruits analysés proviennent d'une seule récolte pour avoir un lot le plus homogène possible. De plus, les prélèvements sont faits au hasard après avoir éliminé seulement quelques individus trop petits ou trop gros, peu représentatifs de la population. Les mesures ont été réalisées fruit par fruit, la variabilité individuelle est établie sur des lots de 6 ou 9 fruits. Nous verrons ultérieurement dans les résultats qu'un échantillonnage de 6 fruits par traitement est apparu généralement suffisant dans nos conditions de cultures très homogènes; ceci en accord avec les conditions analytiques admises par d'autres auteurs (PRATT, 1971).

Conditions de conservation expérimentales admises.

Deux modes de conservation ont été adoptés :

1) A la température ambiante, entre 22 et 25°C (symbole A);

2) En chambre frigorifique à + 4°C (symbole F), avec une protection contre une déshydratation excessive par un emballage des fruits dans un sac plastique perforé.

Ces deux conditions sont celles utilisées couramment pour le stockage de notre matériel en cours de sélection. De plus, la température de + 4°C est proche de la température optimale de conservation frigorifique (entre 0 et + 3,5°C) des Melons de type « *Cantaloup Charentais* » d'après ULRICH (1954).

La durée de conservation d'un lot de 6 fruits est précisée par un chiffre placé avant la lettre symbolisant le mode de stockage.

La répartition des analyses dans le temps est la suivante :

a) Essais de conservation sur la récolte de la culture S. V. :

— température ambiante : 2 jours (2 A) et 4 jours (4 A);
— chambre froide : 5 jours (5 F), 7 jours (7 F) et 15 jours (15 F).

b) Essais de conservation sur la récolte de la culture T. P. :

— température ambiante : 2 jours (2 A) et 5 jours (5 A);
— chambre froide : 7 jours (7 F) et 15 jours (15 F).

Dans chaque récolte, un lot témoin frais a été analysé le jour même de la cueillette : symbole Mo.

Déterminations physiques.

La *grosseur du fruit* est précisée par le poids moyen des 2 récoltes différentes (S. V. et T. P.).

La *forme géométrique* est déterminée par le rapport entre la hauteur prise sur l'axe pédoncule-pistil et le diamètre équatorial.

Le *poids spécifique* de chaque fruit entier est évalué par pesées, avec et sans immersion dans de l'eau à la température de 20°C environ. On utilise le dispositif d'immersion proposé par MACKEY, HARD et ZAEHRINGER (1973).

Le *poids frais des graines* est déterminé après leur séparation du placenta sous un courant d'eau et un essorage rapide entre deux papiers filtres. Pour déterminer le poids sec, les lots de graines sont placés dans une étuve à 100-103°C pendant 10 à 15 heures jusqu'à poids constant.

L'*indice de réfraction* est mesuré sur un réfractomètre 0 à 30 p. 100 de matières solubles, à température voisine de 20°C, ceci sur les liquides provenant de 3 prélèvements distincts :

1) De l'exsudat obtenu par éclatement sous pression de cellules situées dans une zone de chair autour de la cavité des graines;

2) De toutes la pulpe consommable sans écorce ni placenta, broyée et homogénéisée, au mixer, sans dilution;

3) Du jus déféqué à l'acétate de zinc plus du ferrocyanure de potassium (dilution 50/55 ml) et filtré sur papier plissé.

La *fermeté de la chair* est déterminée à l'aide d'un pénétromètre mis au point à la Station de Technologie des Produits végétaux d'Avignon. L'appareil permet de mesurer et d'enregistrer, dans des conditions opératoires reproductibles, la force nécessaire pour faire pénétrer dans la chair du fruit un embout cylindrique à extrémité plane d'un diamètre de 8 mm. On effectue 10 mesures par fruit, réparties uniformément sur le plan équatorial, à mi-distance entre la zone placentaire et l'écorce, dans le sens de l'axe pistil-pédoncule.

Déterminations chimiques.

Le *pH et l'acidité* libre sont déterminés à l'aide de pHmètre titrimètre Metrohm sur 20 ml de jus de la pulpe broyée et centrifugée; puis par dosage à la soude 0,1 N jusqu'à un pH de fin de titration de 8,1.

Les sucres réducteurs sont évalués sur le jus, déféqués par l'acétate de zinc et le ferrocyanure de potassium (50/55 ml) par dosage colorimétrique avec le ferricyanure de potassium à l'aide d'un analyseur automatique TECHNICON.

Les sucres totaux sont obtenus, de la même façon, après hydrolyse enzymatique préalable des jus à l'aide d'invertase (E. C. 3.2.1.26).

La vitamine C (acide déhydroascorbique total), sur les jus déféqués est dosée sous sa forme oxydée, à l'aide de brome selon la méthode OURNAC (1965-1966), après formation de dinitrophénylhydrazone (pendant 3 heures à 37°C) et dissolution en milieu sulfurique à froid. La vitamine C est protégée dès le broyage de la pulpe en opérant en présence de thiourée, en milieu phosphorique acide et à l'abri de la lumière à température ambiante.

Les composés pectiques sont évalués par colorimétrie avec le carbazol sulfurique, à partir d'une gamme étalon sur l'acide galacturonique. Vingt grammes de pulpe broyée et homogénéisée sont stabilisés dans 250 ml d'éthanol bouillant et stockés, après refroidissement, au congélateur. Sur l'insoluble recueilli, on extrait successivement à l'eau, puis à l'acide chlorhydrique 0,2 N, les fractions : pectines solubles et protopectines.

Remarque : la reproductibilité de cette technique s'est révélée faible, de l'ordre de $\pm$ 20 p. 100, compte tenu de la variabilité au niveau de la réactivité des différentes fractions pectiques avec le carbazol sulfurique (difficultés pour stabiliser la coloration, selon les fruits et le stade de maturité).

Les caroténoïdes sont évalués par un indice colorimétrique des pigments extractibles constitués : d'une part, d'une petite fraction de chlorophylles, xanthophylles et caroténols solubles dans l'alcool éthylique, d'autre part, de caroténoïdes du type hydrocarbures non hydroxylés solubles dans l'acétone et les solvants non polaires. On prélève rapidement 25 g de pulpe broyée et homogénéisée. On extrait successivement en plusieurs apports d'abord avec 100 ml d'éthanol 96 GL puis avec 200 ml du mélange acétone-alcool (50-50 v/v) jusqu'à décoloration de l'insoluble resté sur verre fritté n° 3.

Les deux fractions sont déjà clarifiées sur lit de célite puis complétées à 250 ml; elles doivent apparaître limpides après ajustement. On mesure le maximum d'absorption spectrométrique entre 450 et 455 nm. Les teneurs en ces deux différents indices de caroténoïdes, ou de chromophores jaune et orangé, sont données sous forme d'unités de densité optique pour un même volume. Leur somme donne les caroténoïdes totaux exprimés en densité optique sur 10 mm d'épaisseur de l'extrait d'un gramme de pulpe pour 10 ml de solvant.

RÉSULTATS

La figure 1 donne la composition pondérale relative des différentes parties du fruit pour chacun des deux essais. Les évolutions dans le temps des indices de qualité étudiés font l'objet des figures 2 à 9. On a superposé sur un même graphique : d'une part, les lots correspondants aux deux conditions de conservation et, d'autre part, les résultats des melons provenant des deux types de cultures différentes. Toutefois, la confrontation des diverses mesures effectuées sur des lots de melons provenant d'une seule récolte dans chacun des deux essais ne permet pas de tirer des conclusions sur l'intérêt des deux modes culturaux utilisés.

Les tableaux 1 à 6 précisent la valeur moyenne et l'écart type d'un indice considéré sur les lots de fruits analysés le jour même de la cueillette (Mo) et sur l'ensemble des fruits d'un essai, tous traitements confondus.

DISCUSSION

1. — *Poids des fruits et rendements*

Sur l'ensemble des fruits récoltés dans chaque essai, on observe un poids moyen de 620 g sur tous les melons du premier essai (S. V.) et de 760 g pour ceux du deuxième essai (T. P.). Le nombre de fruits a été volontairement limité à 3 par plante, (conduite sur une branche), dans le premier essai (S. V.) et laissé libre dans le second (T. P.), ce qui a permis de récolter 6,6 fruits par plante, (conduite sur deux branches). Ainsi les rendements pondéraux par plante ont été de 1,850 kg pour le premier essai (S. V.) et de 5,030 kg pour le second (T. P.).

La densité de plantation ayant été 3 fois plus forte pour le premier essai en conduite verticale, le rendement par mètre carré au sol est très voisin (S. V. = 3,7 kg/m^2; T. P. : 3,4 kg/m^2); la différence est non significative. Rappelons ici que la comparaison des deux modes de culture n'est pas le but de ce travail. On peut cependant noter que le deuxième essai (T. P.) a donné des fruits plus gros et de calibre plus hétérogène.

La grosseur du fruit peut caractériser une récolte, mais cet indice ne peut être révélateur de la qualité, comme nous le verrons ultérieurement sur les teneurs en sucres des deux essais. La valeur du calibre des Melons est un problème encore très discuté sur un plan commercial.

2. — *Importance relative de l'écorce, de la chair et des graines*

a) La forme géométrique des fruits apparaît très semblable dans les deux essais; ainsi, pour le rapport hauteur/diamètre équatorial, on a noté les valeurs moyennes suivantes : 0,84 (s = 0,06) pour le premier essai (S. V.) et 0,86 (s = 0,06) pour le second essai (T. P.). Ces valeurs ne diffèrent pas significativement, malgré un écart sensible du poids moyen des fruits.

b) La figure 1 montre l'importance relative en poids frais et en poids sec des 4 composants principaux du fruit : l'écorce, la chair, le placenta, les graines. La teneur en matières sèches de l'écorce, de la chair et du placenta est relativement constante aux environs de 10 p. 100; par contre, l'extrait sec des graines varie fortement d'une récolte à l'autre, avec le nombre et la proportion de graines avec ou sans embryon.

La chair seule représente environ 45 p. 100 du poids frais du fruit et 40 p. 100 de l'extrait sec total. Les graines ne représentent seulement que 3 à 5 p. 100 du poids total, mais renferment de 14 à 23 p. 100 de l'extrait sec. Le poids sec de 100 graines avec un embryon normalement développé est de 3,6 g, tandis que celui de 100 graines vides (téguments de taille normale mais sans embryon) est seulement de 0,6 g.

La biosynthèse des graines conditionne fortement les métabolismes de la plante et intervient très probablement sur la qualité de la chair du fruit. C'est la raison pour

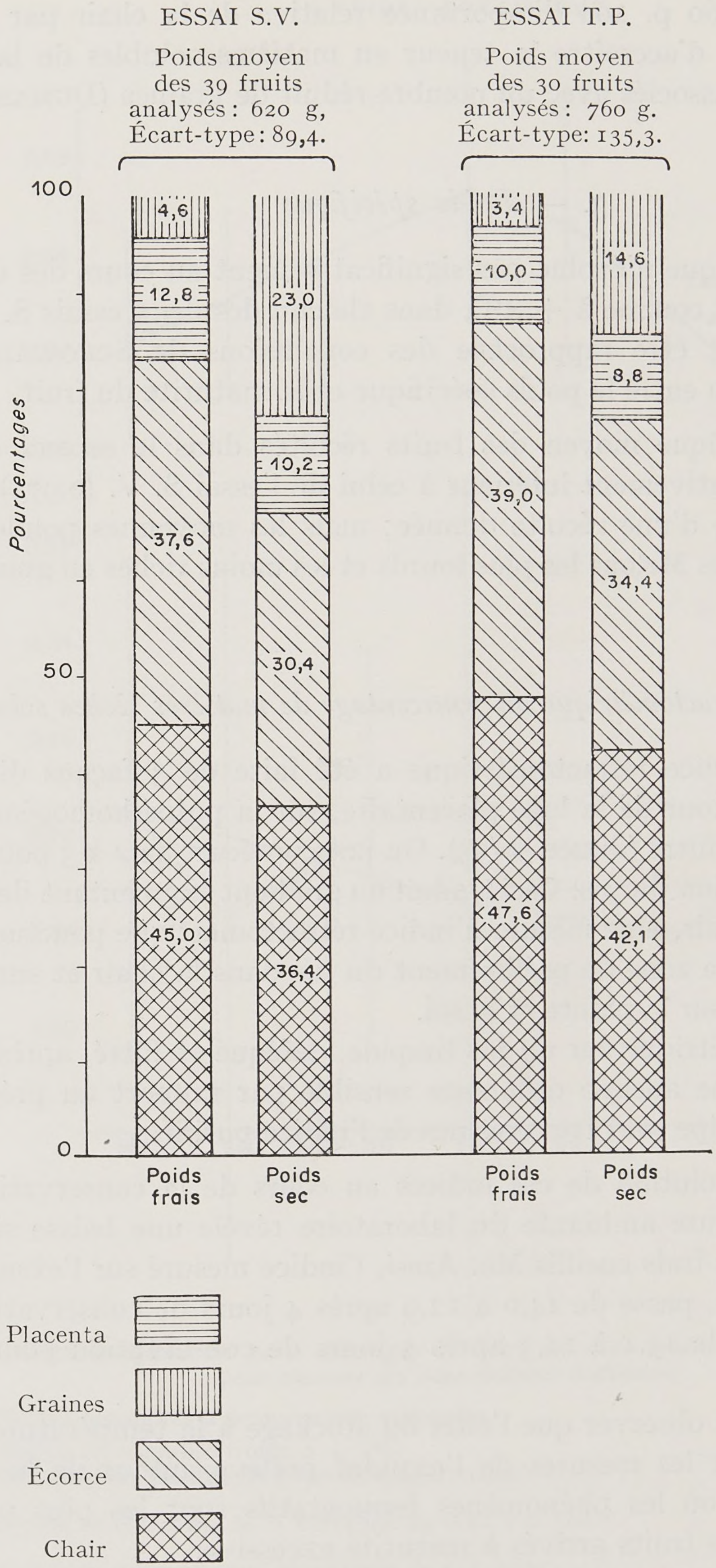


FIG. 1. — *Composition pondérale, en poids frais et en poids sec, des melons de deux cultures différentes.*

Essai S. V. : sous serre verre chauffée, plantes palissées sur une branche, plantation du 26 février 1975.

Essai T. P. : sous serre tunnel plastique, plantes conduites à plat sur deux branches, plantation du 19 avril 1975.

laquelle des travaux sur la parthénocarpie naturelle ou provoquée ont été entrepris afin d'étudier l'influence de l'absence de graines sur la qualité des fruits (RISSER, 1969). D'autre part, on a montré que l'état tétraploïde permettait d'augmenter

sensiblement, jusqu'à 60 p. 100 l'importance relative de la chair par rapport au poids frais du fruit et d'accroître la teneur en matières solubles de la pulpe, ces caractères étant aussi associés avec un nombre réduit de graines (DUMAS de VAULX, 1974).

3. — *Poids spécifique*

a) Le poids spécifique n'évolue pas significativement au cours des deux modes de conservation, à 25°C comme à + 4°C, dans chacun des deux essais S. V. et T. P. Cette observation peut être rapprochée des conclusions de SCHOWALTER (1961) sur l'absence de relation entre le poids spécifique et la maturité du fruit.

b) Le poids spécifique moyen des fruits récoltés dans le second essai T. P. (0,915) est très significativement inférieur à celui de l'essai S. V. (0,975). Ce critère est bien caractéristique d'une récolte donnée; mais les moyennes pondérales de la figure 2 montrent que les Melons les plus lourds et les moins riches en graines ne sont pas les plus denses.

4. — *Indice réfractométrique ou pourcentage de matières sèches solubles*

La mesure de l'indice réfractométrique a été faite de 3 façons distinctes : à partir d'un exsudat autour de la loge placentaire, sur la pulpe homogénéisée et sur le même jus déféqué et filtré (diluée 50/55). On note un écart de 2 à 3 points d'indice selon le mode d'extraction du jus. Ceci traduit un gradient augmentant de l'extérieur vers l'intérieur de la chair. Une mesure d'indice réfractométrique ponctuelle nécessiterait de bien préciser la zone de prélèvement du jus dans la chair et sur le fruit en fonction de sa position sur la plante et le sol.

L'indice réfractométrique sur un jus limpide, déféqué et filtré, après correction de la dilution, ne donne aucune différence sensible par rapport au précédent; les valeurs brutes sur la pulpe sont très voisines de l'indice purifié.

a) En suivant l'évolution de ces indices au cours de la conservation, seul le stockage à la température ambiante du laboratoire révèle une baisse significative par rapport aux melons frais cueillis Mo. Ainsi, l'indice mesuré sur l'exsudat autour de la cavité des graines, passe de 14,0 à 12,9 après 4 jours de conservation pour le premier essai S. V. et de 13,1 à 11,3 après 5 jours de conservation pour le second essai T. P.

On peut cependant observer que l'effet du stockage à la température ambiante est surtout sensible sur les mesures de l'exsudat prélevé autour de la cavité des graines. C'est la zone où les phénomènes fermentatifs sont les plus perceptibles sensoriellement pour des fruits arrivés à maturité excessive.

Par contre, au cour du stockage en chambre froide, cet indice évolue peu dans les deux essais. Le catabolisme, accéléré à la température ambiante, est très ralenti par la réfrigération à + 4°C. Sur la base de ce critère de qualité, le froid permettrait donc une conservation pendant une quinzaine de jours environ, de fruits récoltés mûrs et réfrigérés rapidement.

b) Les valeurs de l'indice réfractométrique du premier essai (S. V.) sont significativement supérieures à celles du second essai (T. P.) comme le montre le tableau 1.

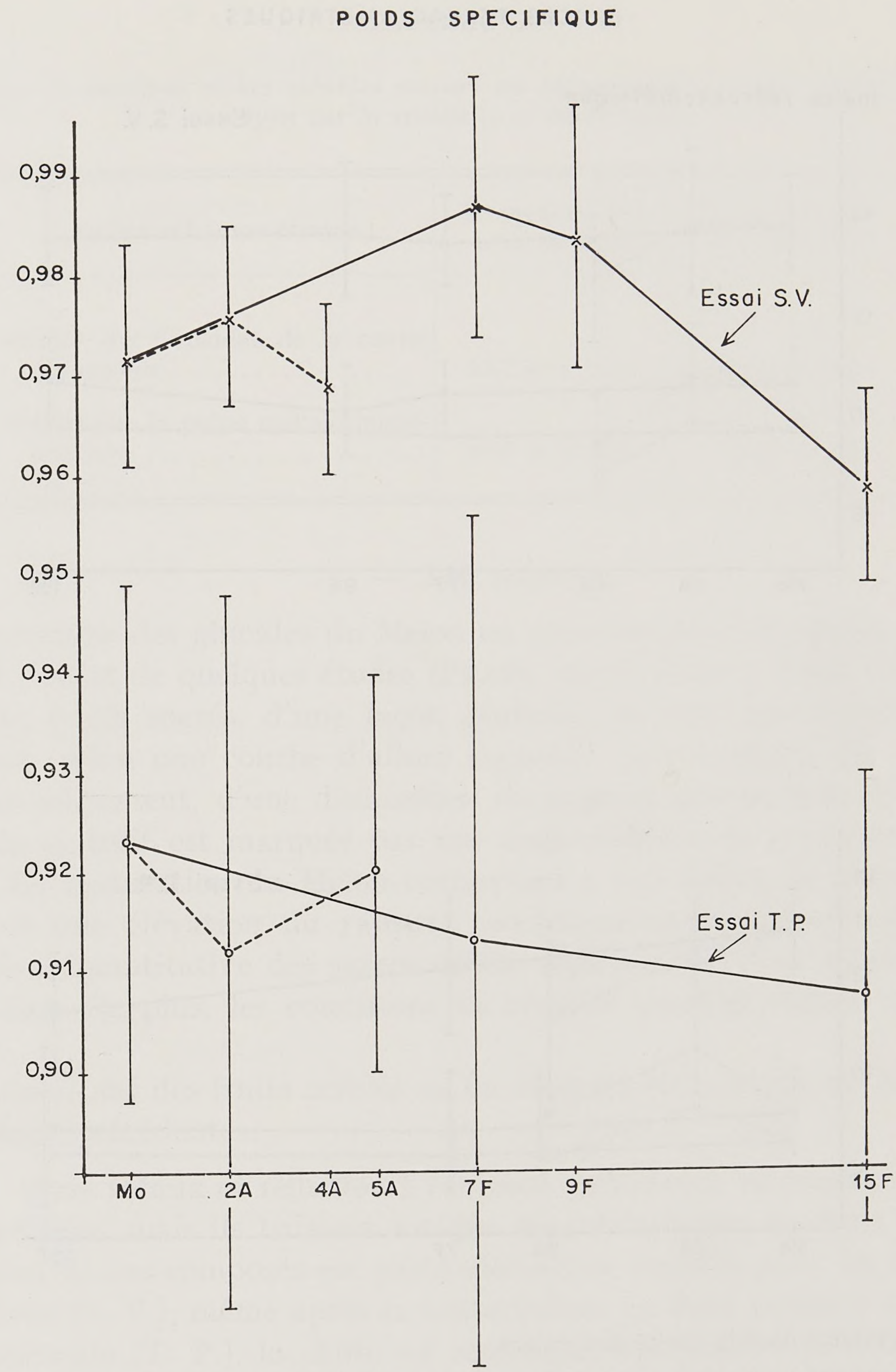


FIG. 2. — *Évolution comparée du poids spécifique au cours des deux modes de conservation pour chacune des deux cultures distinctes.*

A ·········Melons conservés à température ambiante.
F———Melons en chambre froide à + 4°C
(précédés du nombre de jours de conservation).

⊥ ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

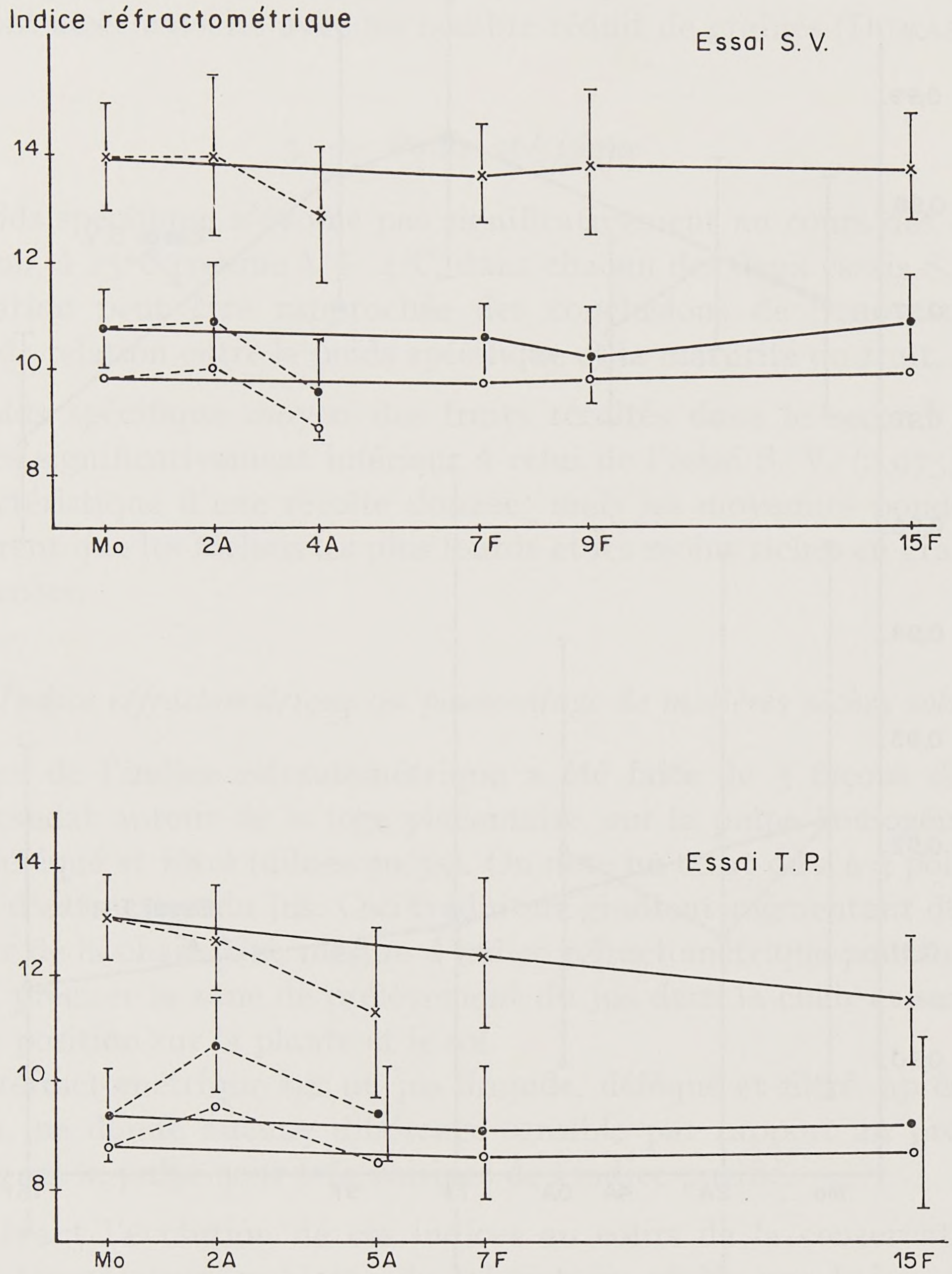
Différences significatives au seuil statistique de 5 p. 100 :

1° Dans chacun des deux essais S. V. et T. P. les valeurs observées ne diffèrent pas significativement.

2° Pour chaque traitement de conservation les valeurs observées dans l'essai S. V. sont significativement supérieures à celles de l'essai T. P.

On peut noter aussi la similitude des écarts types pour les deux modes de mesures. Le gradient entre les deux indices est 3,1 pour le premier essai et de 2,6 pour le second; une valeur plus élevée de l'indice réfractométrique ne correspond donc pas à une meilleure répartition des substances solubles de la chair.

INDICES REFRACTOMETRIQUES



x I. R. mesuré dans la cavité des graines.

● I. R. mesuré sur le jus brut après broyage de la chair.

o I. R. mesuré à partir du jus déféqué (dilution 50/55).

FIG. 3. — *Évolution comparée de l'indice réfractométrique mesuré sur trois prélèvements différents, au cours des deux modes de conservation dans chacun des deux essais.*

A········· Melons conservés à température ambiante.

F——— Melons en chambre froide à + 4°C
(précédés du nombre de jours de conservation).

Ɪ ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

Différences significatives au seuil statistique de 5 p. 100 (indice réfractométrique mesuré dans la cavité des graines) :

- Essai S. V. : les moyennes ne diffèrent pas significativement.
- Essai T. P. : Mo supérieur à 5 A; supérieur à 15 F.

TABLEAU I

Pourcentage de matières sèches solubles mesuré au réfractomètre : indice réfractométrique moyen sur la récolte (s = écart type)

Indice réfractométrique	1er essai (S. V.) n = 39 fruits	2e essai (T. P.) n = 30 fruits
Mesuré sur l'exsudat de la cavité des graines	13,7 (s = 1,2)	12,2 (s = 1,3)
Mesuré sur la pulpe globale homogénéisée	10,6 (s = 1,1)	9,6 (s = 1,3)

5. — *Les sucres*

La biosynthèse des glucides du Melon en cours de développement et de maturation a fait l'objet de quelques études (Pratt, 1971). Comme dans le métabolisme de nombreux fruits sucrés, d'une façon générale, on note une accumulation des sucres totaux, selon une courbe d'allure sigmoïde, accompagnée dès les premiers stades du grossissement, d'une diminution du rapport glucose/fructose. La fin de croissance de ce fruit est marquée par une augmentation de la teneur relative en saccharose. La maturation du Melon correspond à une baisse du glucose, puis du fructose et à une élévation du rapport saccharose/sucres réducteurs. Toutefois, cette évolution quantitative des sucres diffère sensiblement d'un cultivar à l'autre (Bianco, 1969). De plus, les conditions de récoltes peuvent influer aussi sur ces phénomènes.

Nos mesures sur des fruits arrivés en fin de maturité confirment ou complètent les observations précédentes.

a) Les sucres totaux et réducteurs évoluent faiblement au cours du stockage à basse température, mais ils baissent lorsque les catabolismes du fruit s'accélèrent. La diminution de ces composés est particulièrement sensible pour les melons de la culture précoce (S. V.), même après la conservation au froid pendant 9 jours. Pour la culture suivante (T. P.), la chute est seulement significative pour le stockage à température ambiante. Toutefois, dans les deux cas; la différence entre sucres totaux et réducteurs, qui représente essentiellement du saccharose, reste relativement constante quelles que soient les conditions de conservation.

b) Comme le montre le tableau 2, la teneur en sucres totaux des melons du premier essai (S. V.) est significativement supérieure à celle des fruits du second essai (T. P.) Mais en plus de la quantité, la nature des sucres influe aussi sur la valeur gustative réelle. Rappelons que les pouvoirs sucrants sensiblement plus élevés du saccharose (pouvoir sucrant conventionnel 1) et surtout du fructose (p. s. relatif 1,73) par rapport au glucose (p. s. relatif 0,74) sont favorables à une meilleure perception gustative sur la base d'une teneur pondérale identique en sucres totaux. Ainsi on remarque au tableau 2 que les fruits du second essai (T. P.) possèdent des teneurs en saccharose significativement supérieures à celles des melons du premier essai (S. V.). Si l'on calcule le rapport saccharose/sucres réducteurs, on obtient 0,60

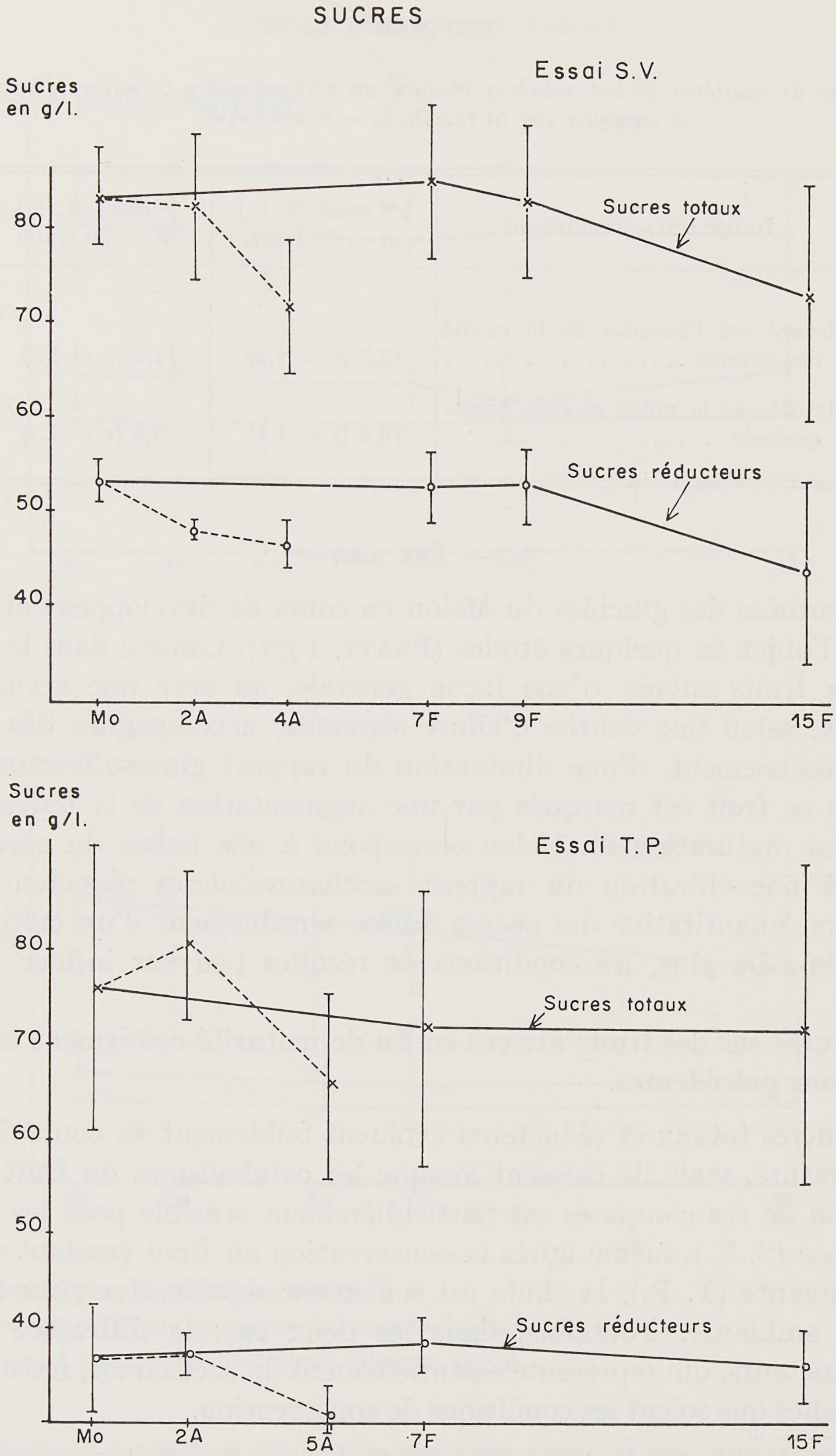


FIG. 4. — *Évolution des sucres totaux et réducteurs au cours des deux modes de conservation, dans chacun des deux essais.*

A·········Melons conservés à température ambiante.
F————Melons en chambre froide à + 4°C
(précédés du nombre de jours de conservation).

⊥ ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

Différences significatives au seuil statistique de 5 p. 100 :

- Essai S. V. :
 Sucres totaux : 4 A inférieur Mo, 2 A, 7 F, 9 F.
 Sucres réducteurs : Mo supérieur 2 A, 4 A, 15 F; 2 A inférieur 7 F, 9 F; 4 A inférieur 7 F, 9 F.
- Essai T. P. :
 Sucres totaux : 2 A supérieur à 5 A.
 Sucres réducteurs : 2 A supérieur à 5 A; 7 F supérieur à 5 A; 15 F supérieur à 5 A.

pour l'essai S. V. et 1,04 pour l'essai T. P.; et le rapport saccharose/sucres totaux est de 0,38 pour l'essai S. V. et de 0,51 pour l'essai T. P.

TABLEAU 2

Teneurs en sucres totaux et saccharose dans chacun des deux essais

	1er essai (S. V.)			2^{e} essai (T. P.)		
	Nombre de fruits	Moyenne	Écart-type	Nombre de fruits	Moyenne	Écart-type
Teneurs en *sucres totaux* (en g/l)						
– des fruits analysés le jour de la cueillette (Mo)	9	83,1	5,03	6	76,3	15,6
– de l'ensemble des fruits tous traitements confondus	39	80,1	9,6	30	73,6	13,0
Teneurs en *saccharose* (en g/l)						
– des fruits analysés le jour de la cueillette (Mo)	9	29,7	3,9	6	39,6	12,4
– de l'ensemble des fruits tous traitements confondus	39	30,0	7,4	30	37,5	11,9

Le jugement gustatif de ces lots n'a pas pu être effectué pour des raisons matérielles. Cependant, les proportions relatives des différents sucres peuvent expliquer des différences de saveur sucrée, à teneurs en sucres totaux égales, que l'on a pu rencontrer dans des essais précédents. De plus, lorsque le niveau des sucres est supérieur aux limites admises précédemment d'autres composés participent plus ou moins favorablement à la sapidité et à la flaveur.

6. — *Fermeté*

a) Au cours de la conservation on note une baisse importante de la fermeté de la chair. Cette chute est très accusée pour les Melons conservés à température ambiante. En 4 jours on passe d'une force de pénétration nécessaire de 440 g à 10 g dans le premier essai S. V. et de 650 g à 110 g en 5 jours dans le second essai T. P. Ainsi, la conservation à une température relativement modérée (22 à 25 °C) entraîne, en moins de 48 heures, un catabolisme sensible sur la texture de la chair du fruit.

Par contre, après 15 jours de conservation à + 4 °C, la fermeté se maintient respectivement à 144 g (S. V.) et 330 g (T. P.). Si l'on admet qu'une fermeté inférieure à 120-150 g est l'indice d'une dégradation importante de la texture de la chair du Melon, à la limite de la commercialisation, on constate que des fruits cueillis mûrs et stockés pendant 15 jours au froid sont encore propres à la consommation.

b) Ces résultats montrent que la fermeté varie d'une façon importante d'un essai cultural à l'autre, mais l'évolution de cette fermeté reste la même; car si on effectue un décalage d'ordonnées à l'origine des deux récoltes, on observe une bonne

superposition des courbes. L'écart initial de fermeté des deux productions est maintenu quelle que soit l'évolution en cours de stockage.

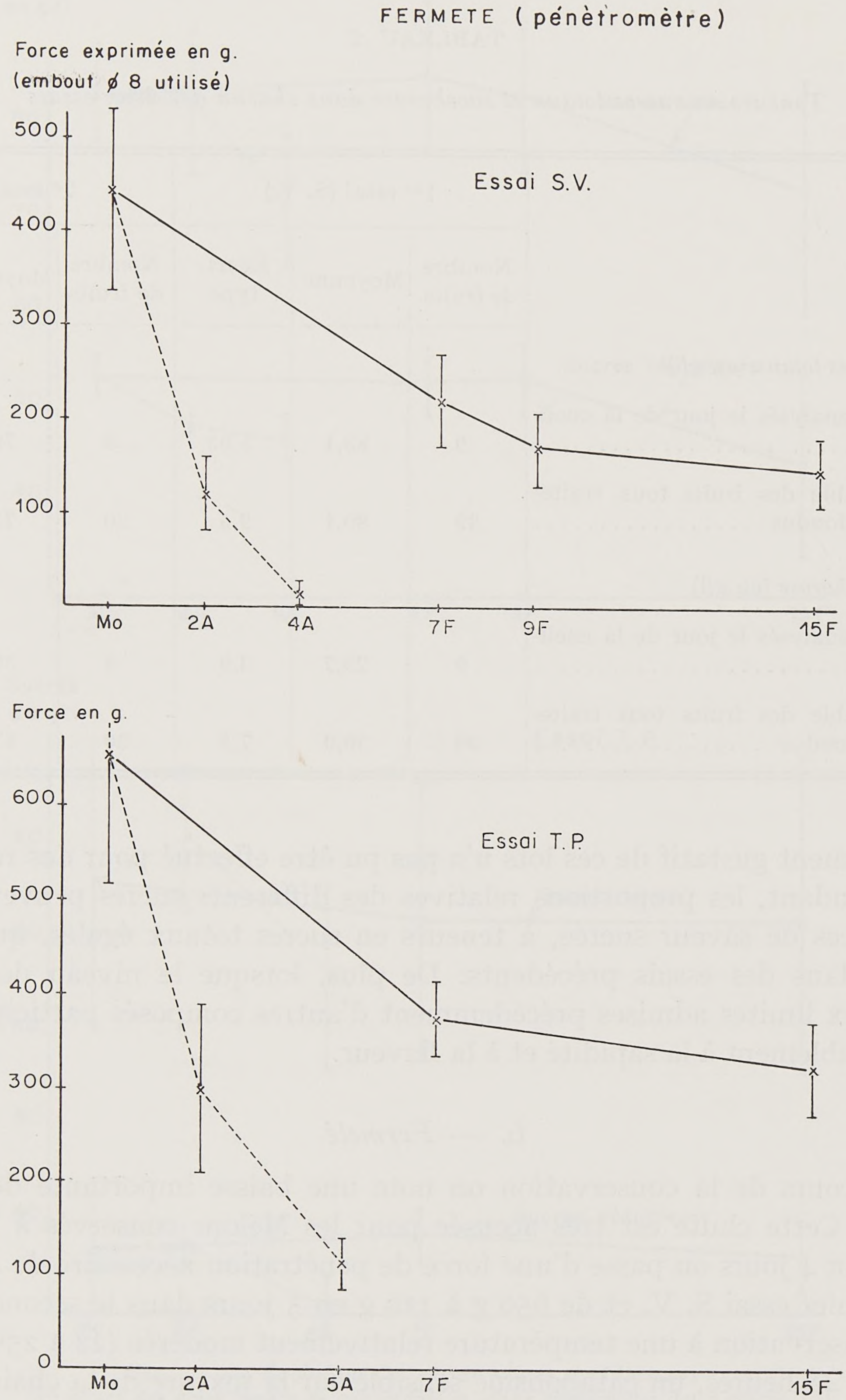


FIG. 5. — *Évolution de la fermeté de la chair mesurée au pénétromètre au cours des deux modes de conservation dans chacun des deux essais.*

A-------- Melons conservés à température ambiante.

F ——— Melons en chambre froide à + 4°C (précédés du nombre de jours de conservation).

⌶ L'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

Différences significatives au seuil statistique de 5 p. 100 :

- Essai S. V. : toutes les valeurs observées diffèrent significativement.
- Essai T. P. : Mo supérieur à 2 A, 5 A, 7 F, 15 F ; 5 A inférieur à 2 A, 7 F, 15 F.

7. — *Pectines solubles et composés pectiques*

Compte tenu de la grande variabilité individuelle des caractères du fruit, due en partie à l'imprécision du dosage des fractions pectiques, ces substances ne constituent pas dans le cas du Melon et pour cette expérimentation, un moyen biochimique précis pour contrôler la qualité de texture de ce fruit. De plus, ces substances sont peu importantes pondéralement : pectines totales (S. V.) moins de 120 mg et (T. P.) moins de 180 mg pour 100 g de matière fraîche exprimés en acide galacturonique (soit 0,1 à 0,2 p. 100 du poids frais), en bon accord avec les données de la littérature (PRATT, 1971).

Conformément à des observations faites sur d'autres fruits (ULRICH, 1952), les protopectines chutent au bénéfice des pectines solubles, pendant la fin de la maturation et l'entreposage à température modérée. Le rapport pectines solubles/pectines totales évolue entre 75 et 87 p. 100 dans l'essai (S. V.) par contre il reste pratiquement constant (79,9 à 81,2 p. 100) dans le deuxième essai (T. P.).

La faible représentativité de ces indices pour traduire la fermeté de la chair, nous incite à penser que d'autres facteurs doivent intervenir de façon importante sur les mesures au pénétromètre. L'étude des teneurs en cellulose des parois cellulaires et des fibres de la chair serait à faire; ce constituant étant relativement abondant dans certains cultivars (PRATT, 1971).

8. — *Acidité*

Les données de la littérature (PRATT, 1971) ne permettent pas de connaître la répartition précise des principaux acides organiques des melons : acide citrique, essentiellement, salifié en partie, et quelques autres moins fréquemment signalés : malique, formique, caféique, etc. La composition est vraisemblablement variable d'un cultivar à l'autre et fonction du stade de récolte. Dans les deux essais de conservation de notre étude, on note une légère baisse de l'acidité, en accord avec une augmentation du pH. Cette évolution est plus accentuée pendant la conservation à température ambiante. La diminution n'est toutefois significative que pour les fruits de la première culture, celle ayant la plus forte acidité sur les melons frais.

Dans le tableau 3, sont indiquées les teneurs moyennes en acides libres exprimées de deux façons différentes. Tous traitements de conservation confondus, les fruits du premier essai (S. V.) sont significativement plus acides que ceux du second essai (T. P.).

TABLEAU 3

Teneurs en acides libres pour l'ensemble des melons analysés (tous traitements confondus) *dans chacun des deux essais*

Acidité libre	1er essai (S. V.) n = 39 fruits		2e essai (T. P.) n = 30 fruits	
	Moyenne	Écart-type	Moyenne	Écart-type
En meq. NaOH 0,1 N pour 20 ml de jus. .	3,26	1,18	1,95	0,55
En mg d'acide citrique pour 100 ml de jus.	104,32	37,76	62,40	17,60

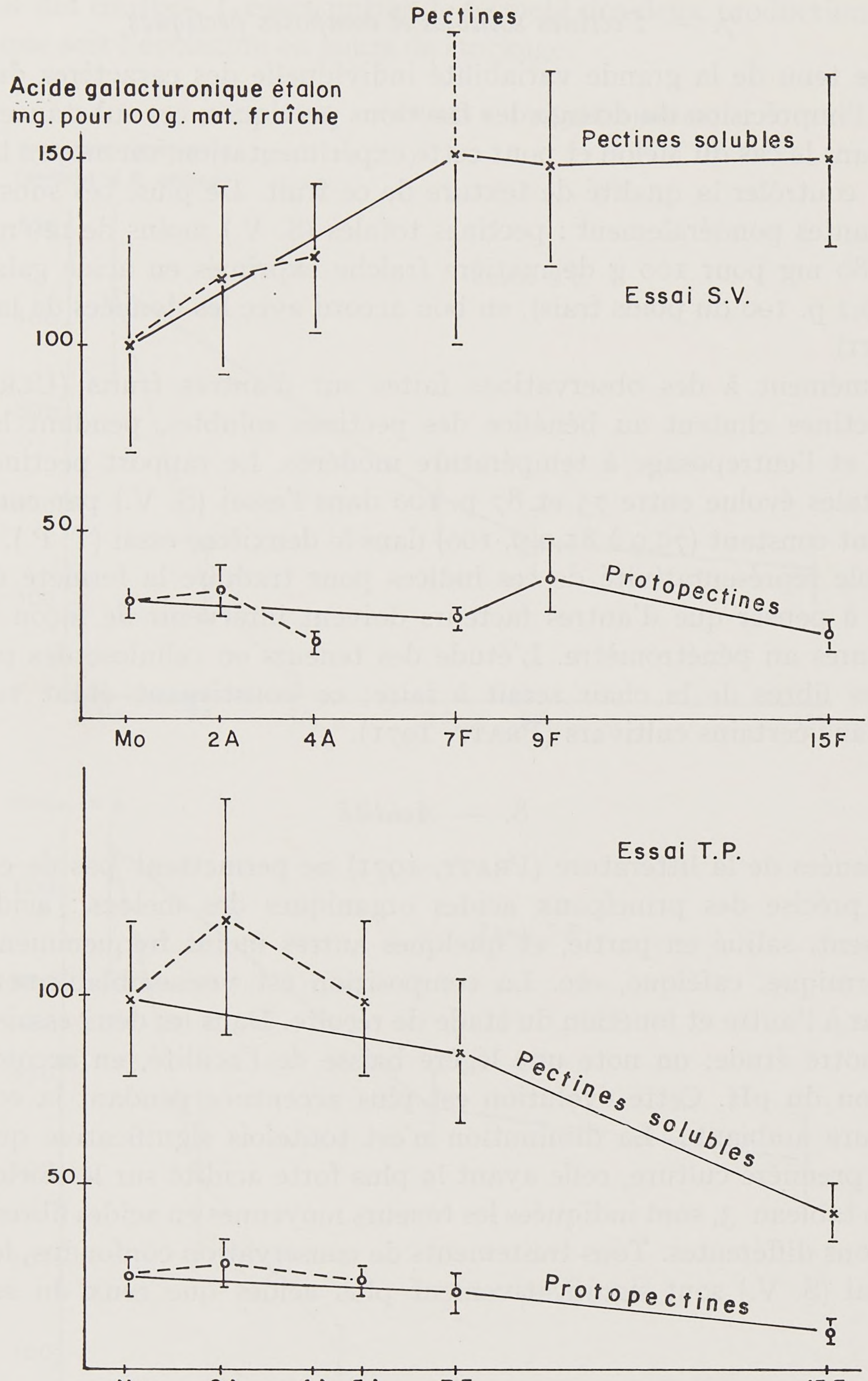


FIG. 6. — *Évolution des teneurs en pectines solubles et des protopectines au cours des deux modes de conservation, dans chacun des deux essais.*

A........ Melons conservés à température ambiante.
F———— Melons en chambre froide à + 4°C
(précédés du nombre de jours de conservation).

Ɪ ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

Différences significatives au seuil statistique de 5 p. 100 :

- Essai S. V. :
 Pectines solubles : Mo inférieur à 7 F, 9 F, 15 F; 2 A inférieur à 15 F; 4 A inférieur à 15 F.
 Protopectines : Toutes les valeurs diffèrent significativement sauf Mo = 2 A.
- Essai T. P. :
 Pectines solubles : Mo supérieur à 15 F, 2 A supérieur à 7 F, 15 F; 15 F inférieur à 5 A, 7 F.
 Protopectines : 15 F inférieur à Mo, 2 A, 5 A, 7 F; 2 A supérieur à 7 F.

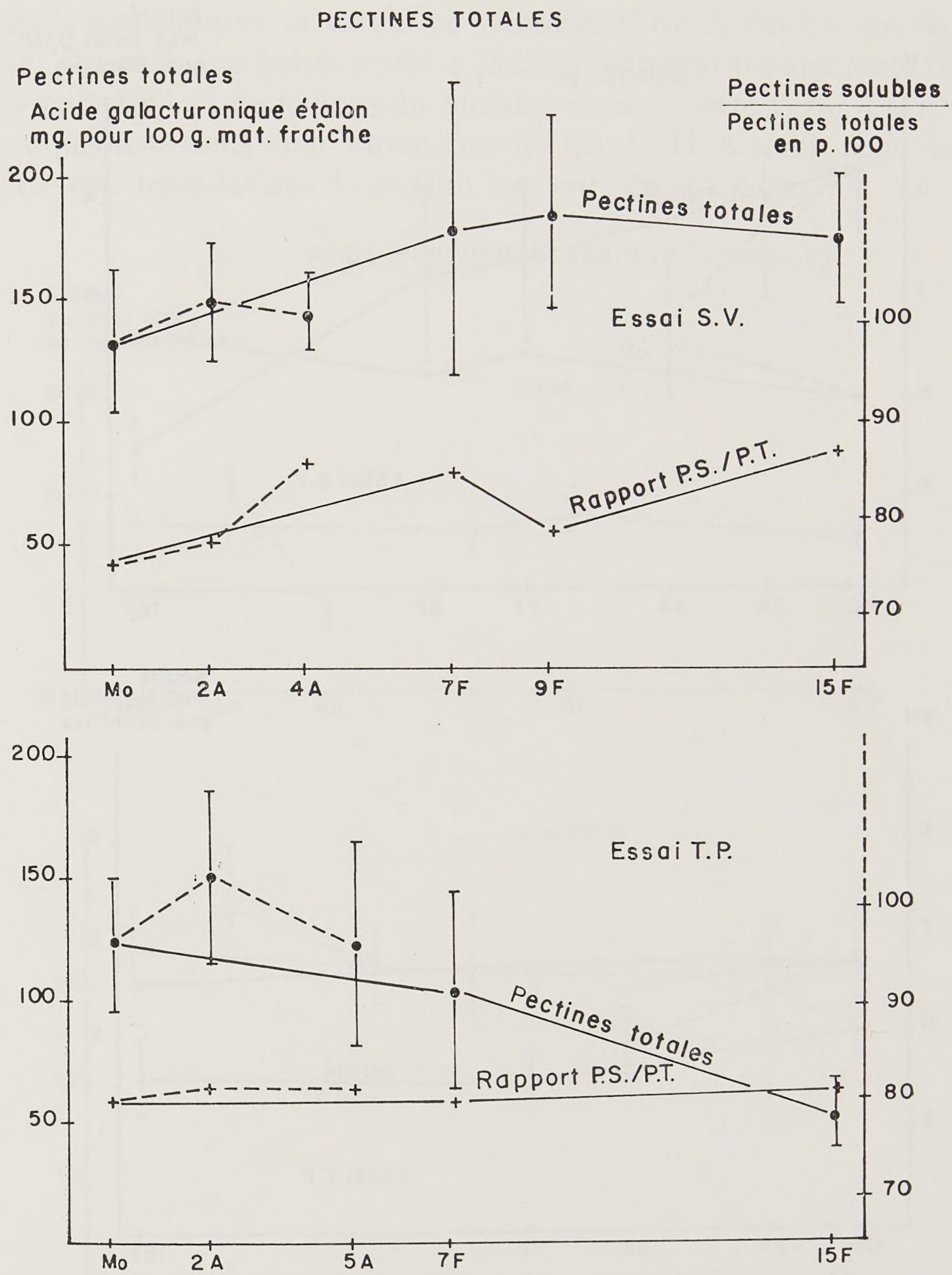


Fig. 6 *bis*. — *Évolution des teneurs en pectines totales et du rapport pectines solubles/pectines totales au cours des deux modes de conservation, dans chacun des deux essais.*

A......... Melons conservés à température ambiante.

F———— Melons en chambre froide à + 4°C (précédés du nombre de jours de conservation).

± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

9. — *Vitamine C* (en acide déhydroascorbique total)

D'après les références de Pratt (1971), le Melon du type « *Cantaloupe américain* » renferme des teneurs variables en vitamine C selon l'origine des productions. Elle est trouvée en majeure partie sous la forme réduite acide ascorbique. La composition moyenne rapportée est ainsi la suivante : Acide ascorbique = 20 à 40 mg, Acide déhydroascorbique = 7 à 10 mg, Acide dicétogulonique = 2 à 2,5 mg pour 100 g de matière fraîche.

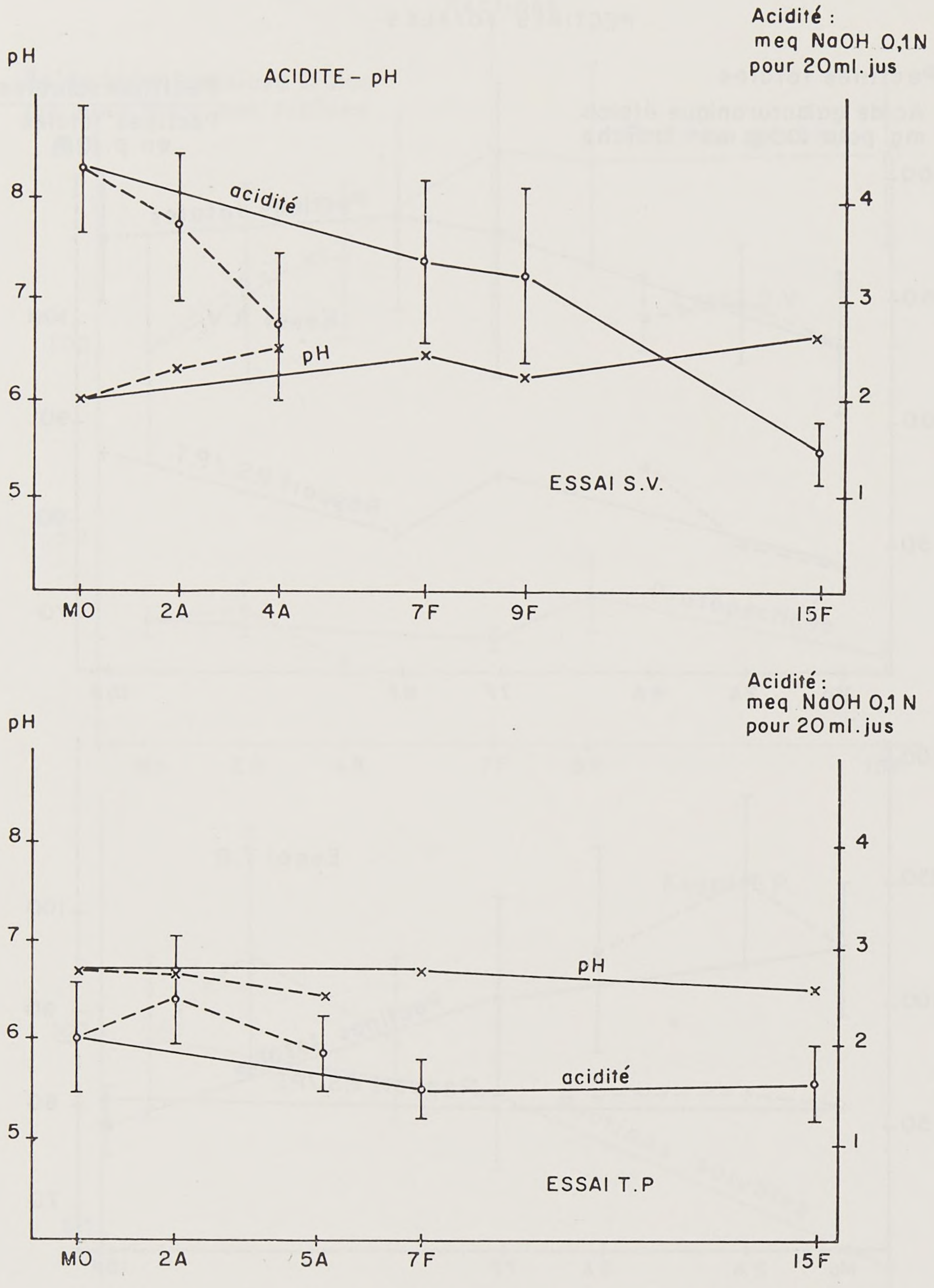


FIG. 7. — *Évolution de l'acidité et du pH au cours des deux modes de conservation, dans chacun des deux essais.*

A......... Melons conservés à température ambiante.

F_________ Melons en chambre froide à + 4°C
(précédés du nombre de jours de conservation).

⌶ ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

Différences significatives au seuil statistique de 5 p. 100 :

- Essai S. V. :
 pH : Mo inférieur à 2 A, 4 A, 7 F, 9 F, 15 F; 15 F supérieur à 2 A, 9 F.
 Acidité : Mo supérieur à 4 A, 7 F, 9 F, 15 F; 2 A supérieur à 4 A, 15 F; 15 F inférieur à 4 A, 7 F, 9 F.
- Essai T. P. : les valeurs observées ne diffèrent pas significativement.

Nos résultats obtenus dans des conditions très différentes, et exprimés en acide déhydroascorbique oxydé total, concordent avec les valeurs précédentes.

On peut faire des observations générales sur les valeurs moyennes des lots analysés frais ou après stockage.

a) D'après nos mesures, la teneur en vitamine C totale évolue peu en cours de conservation. On note une baisse après 4 jours à température ambiante, seulement significative pour les lots de melons du premier essai en serre verre. La vitamine C, dosée spécifiquement sous une forme oxydée (A. D. H. A.) est donc faiblement représentative des dégradations de ce fruit au cours du stockage.

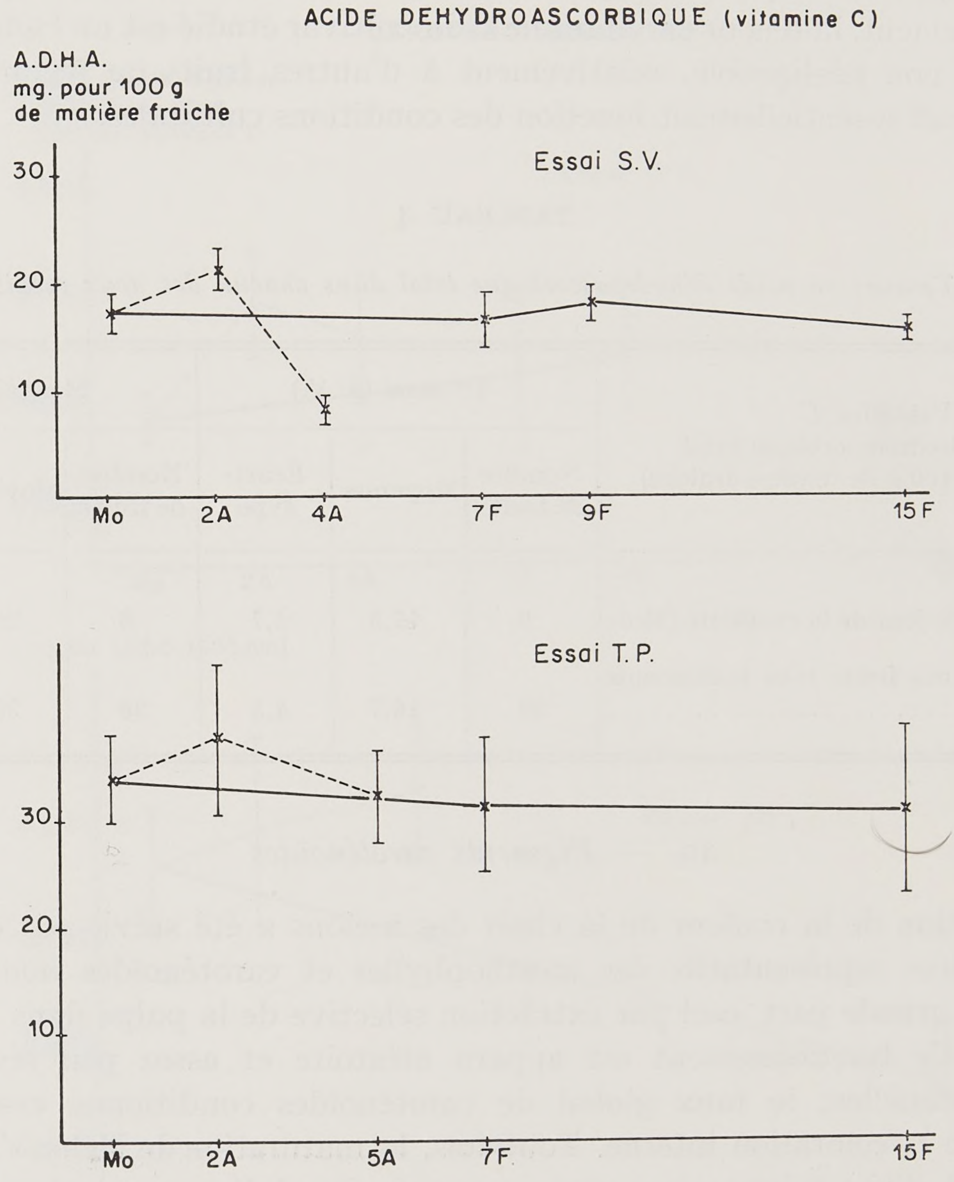


FIG. 8. — *Évolution de la teneur en vitamine C au cours des deux modes de conservation, dans chacun des deux essais.*

A......... Melons conservés à température ambiante.
F———Melons en chambre froide à + 4°C (précédés du nombre de jours de conservation).

⊥ ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

Différences significatives au seuil statistique de 5 p. 100 :

- Essai S. V. : Mo inférieur à 2 A et Mo supérieur à 4 A; 2 A supérieur à 4 A, 7 F, 9 F, 15 F; 4 A inférieur à 7 F, 9 F, 15 F; 9 F supérieur à 15 F.
- Essai T. P. : les valeurs observées ne diffèrent pas significativement.

b) On note une différence très importante entre les deux essais. Les melons du tunnel plastique ont une teneur en vitamine C double de celle des fruits cultivés en serre chauffée. Cet écart est très significatif, compte tenu de la variabilité relativement faible du caractère par rapport à d'autres constituants; il serait hasardeux

d'attribuer ce résultat à une façon culturale particulière comme : la conduite sur une ou deux branches, la pollinisation ou la charge en fruits. Plus spécialement, les effets de la chaleur en serre verre ou des variations de température au sol en culture abritée, seraient à étudier; de plus la couverture plastique pourrait intervenir par ses propriétés de transmission de la lumière, différentes de celles du verre (les plastiques usuels arrêtent à plus de 90 p. 100 les rayons ultra-violets solaires).

Pratiquement, la teneur en vitamine C du cultivar étudié est un facteur d'intérêt nutritionnel non négligeable, relativement à d'autres fruits ou légumes, mais sa valeur apparaît essentiellement fonction des conditions culturales.

TABLEAU 4

Teneurs en acide déhydroascorbique total dans chacun des deux essais

Vitamine C Acide déhydroascorbique total (en mg pour 100 g de matière fraîche)	1er essai (S. V.)			2e essai (T. P.)		
	Nombre de fruits	Moyenne	Écart-type	Nombre de fruits	Moyenne	Écart-type
Fruits analysés le jour de la cueillette (Mo) .	9	17,3	1,7	6	33,9	4,0
Sur l'ensemble des fruits tous traitements confondus	39	16,7	4,5	30	33,2	6,6

10. — *Pigments caroténoïdes*

L'évolution de la couleur de la chair des melons a été suivie par des analyses sur des indices représentatifs des xanthophylles et caroténoïdes non hydroxylés pour la plus grande part, ceci par extraction sélective de la pulpe dans des solvants appropriés. Ce fractionnement est apparu aléatoire et assez peu révélateur des différences visuelles; le taux global de caroténoïdes conditionne essentiellement l'intensité de la coloration interne. Toutefois, la maturation du Melon s'accompagne généralement d'une teinte rouge plus accentuée due à l'augmentation relative des caroténoïdes chromogènes du type lycopène (PRATT, 1971). Précisons que l'influence des chlorophylles, dans l'écorce et les zones externes du mésocarpe, est faible car notre analyse ne porte que sur la partie de chair consommée.

L'interprétation des résultats obtenus apparaît difficile, compte tenu de la variabilité individuelle des melons et d'un dosage délicat pour ce type de constituants non hydrosolubles dans une pulpe.

a) Les caroténoïdes n'évoluent pas sensiblement en cours de conservation. On note cependant une légère augmentation pour les lots conservés à la température ambiante. La biosynthèse de ces pigments est stimulée par la chaleur et l'on peut admettre qu'elle continue dans le Melon au cours du stockage à la température ambiante.

Par contre, le maintien des lots à basse température et à l'obscurité, en freinant le métabolisme des caroténoïdes n'a entraîné qu'une très légère augmentation des

teneurs pour l'essai (S. V.). Pour l'essai (T. P.) on a observé une baisse sensible notamment pour le lot 15 F. Cet écart difficile à expliquer pourrait provenir d'une erreur expérimentale toujours possible.

Pratiquement, pour le cultivar « *Doublon* » et dans les conditions culturales étudiées, la réfrigération n'apporte pas d'effets nettement défavorables sur la coloration de la chair pendant une durée de conservation supérieure à une semaine.

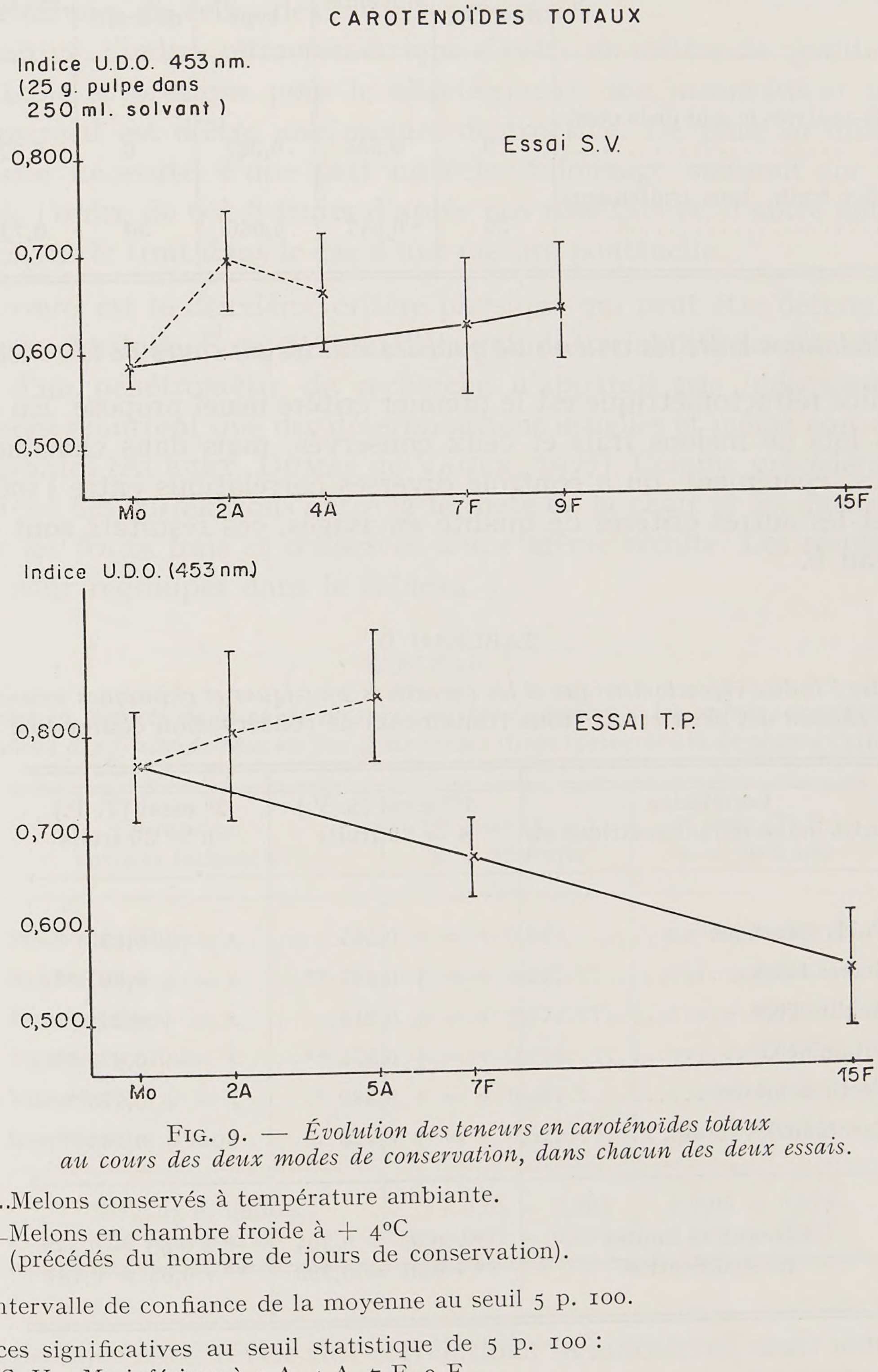


FIG. 9. — *Évolution des teneurs en caroténoïdes totaux au cours des deux modes de conservation, dans chacun des deux essais.*

A.......... Melons conservés à température ambiante.
F———— Melons en chambre froide à + 4°C
(précédés du nombre de jours de conservation).

I ± l'intervalle de confiance de la moyenne au seuil 5 p. 100.

Différences significatives au seuil statistique de 5 p. 100 :
- Essai S. V. : Mo inférieur à 2 A, 4 A, 7 F, 9 F.
- Essai T. P. : Mo supérieur à 7 F, 15 F ; 5 A supérieur à 7 F, 15 F ; 2 A supérieur à 7 F, 15 F ; 7 F supérieur à 15 F.

b) Comme le montre le tableau 5, les teneurs en caroténoïdes totaux des melons de l'essai (T. P.) sont significativement supérieures à celles du premier essai (S. V.), pour les lots Mo frais et pour tous les lots de conservation confondus.

TABLEAU 5

Couleur de la chair des melons d'après le taux de pigments extractibles dans chacun des deux essais

Caroténoïdes totaux (en U.D.O. 453 nm (sur 10 mm) pour 1 g de pulpe dans 10 ml d'extrait)	1er essai (S. V.)			2e essai (T. P.)		
	Nombre de fruits	Moyenne	Écart-type	Nombre de fruits	Moyenne	Écart-type
Teneur des fruits analysés le jour de la cueillette (Mo)	9	0,585	0,027	6	0,770	0,064
De l'ensemble des fruits, tous traitements confondus	39	0,647	0,066	30	0,726	0,124

II. — *Relations entre les critères de qualités étudiés au cours de la conservation*

a) L'indice réfractométrique est le premier critère usuel proposé. En regroupant ensemble les lots de melons frais et ceux conservés, mais dans chacune des deux récoltes prises séparément, on a contrôlé diverses corrélations entre l'indice réfractométrique et les autres critères de qualité envisagés, ces résultats sont rassemblés dans le tableau 6.

TABLEAU 6

Corrélations entre l'indice réfractométrique et les caractères physiques et chimiques mesurés des fruits de chacun des deux essais (tous traitements de conservation confondus)

Corrélation entre indice réfractométrique et:	1er essai (S. V.) $n = 39$ fruits	2e essai (T. P.) $n = 30$ fruits
Poids spécifique	$r = + 0{,}264$	$r = + 0{,}133$
Sucres totaux	$r = + 0{,}697$ **	$r = + 0{,}867$ **
Acidité libre	$r = + 0{,}218$	$r = + 0{,}312$
Vitamine C	$r = + 0{,}574$ **	$r = + 0{,}879$ **
Pectines totales	$r = + 0{,}389$ *	$r = + 0{,}473$ *
Caroténoïdes totaux	$r = + 0{,}130$	$r = + 0{,}405$ *
Niveaux et limites de signification	* r 0,05 = 0,304 ** r 0,01 = 0,393	* r 0,05 = 0,349 ** r 0,05 = 0,487

Une corrélation hautement significative est confirmée entre l'indice réfractométrique et la teneur en sucres totaux dans chacun des deux essais. Mais il est intéressant de noter aussi les corrélations significatives entre l'indice réfractométrique et la teneur en vitamine C, en pectines totales et en caroténoïdes totaux sur une récolte. Mais ces constituants évoluant relativement peu au cours de la conservation au froid et même à température ambiante, on peut admettre que l'indice réfracto-

métrique reflète grossièrement la qualité globale du fruit mûr au stade commercial sur le marché. Sur un plan fondamental, il y a quelques liens communs dans la biosynthèse des composés analysés. De bonnes conditions de croissance du fruit s'accompagnent d'une accumulation parallèle des diverses substances hydrosolubles relativement bien traduites par l'indice réfractométrique. Cependant, les composés pectiques et les caroténoïdes sont sous la dépendance de voies métaboliques différentes plus éloignées de celles des indices précédents.

En définitive, l'indice réfractométrique s'avère un critère de qualité fondamentalement valable et pratique pour le sélectionneur; son inconvénient principal au niveau commercial est d'être une mesure destructive. De plus, sa mise en œuvre conventionnelle nécessite d'une part un échantillonnage suffisant sur une récolte homogène, de l'ordre de 6 à 8 fruits d'après nos résultats et, d'autre part, un prélèvement précis sur le fruit dans le cas d'une mesure ponctuelle.

b) *La fermeté* est le deuxième critère physique qui peut être déterminé avec un un appareillage classique. Compte tenu de la grande variabilité des mesures obtenues, l'utilisation d'un pénétromètre de recherche n'apparaît pas indispensable et des essais en ce sens montrent que des déterminations usuelles et même non destructives sont envisageables (AUBERT, DUMAS de VAULX, 1977). Comme précédemment, nous avons recherché des corrélations entre la fermeté de la chair et les autres critères de qualité pour les fruits frais et conservés d'une même récolte. Les résultats les plus intéressants sont regroupés dans le tableau 7.

TABLEAU 7

Corrélation entre la fermeté de la chair mesurée au pénétromètre et les autres caractères physiques ou chimiques mesurés des fruits de chacun des deux essais (tous traitements de conservation confondus)

Corrélation entre la fermeté et :	1er essai (S. V.) n = 39 fruits	2e essai (T. P.) n = 30 fruits
Poids spécifique	r = + 0,089	r = + 0,048
Acidité libre	r = — 0,535 **	r = + 0,234
Protopectines	r = + 0,572 **	r = + 0,070
Pectines solubles	r = — 0,216	r = + 0,018
Vitamine C	r = + 0,369 *	r = + 0,103
Caroténoïdes totaux	r = + 0,529 **	r = — 0,107
Niveaux et limites de signification	* r 0,05 = 0,304 ** r 0,01 = 0,393	r 0,05 = 0,349 r 0,01 = 0,487

Seul le premier essai révèle des corrélations significatives, mais non confirmées sur le deuxième; ceci impose de grandes réserves dans les interprétations possibles.

— La diminution de la fermeté des melons du premier essai s'accompagne d'une baisse peu sensible des protopectines, au profit des pectines solubles. La faiblesse des coefficients de corrélation confirme le peu d'influence des composés pectiques dans la tenue mesurée au pénétromètre de melons cueillis mûrs, ainsi que vu précédemment.

On note aussi que la fermeté et l'acidité libre, évoluant dans le même sens pendant le stockage, sont néanmoins en corrélation négative dans le cas de la première culture. Les fruits les plus acides seraient ceux ayant la moins bonne tenue ; la dégradation des parois cellulaires par les acides est un phénomène connu (Ulrich, 1952).

— L'absence de chiffres significatifs sur l'ensemble des résultats de la deuxième culture indique une indépendance des indices considérés, lorsque le catabolisme des fruits est relativement faible. La fermeté du fruit mûr n'apparaît pas comme un indice de la composition biochimique à l'inverse de l'indice réfractométrique.

De plus, la fermeté et la tenue du fruit (tout comme les valeurs de l'indice réfractométrique) sont sans relation avec le poids spécifique du fruit entier. Ce dernier critère physique s'avère donc de peu d'intérêt pratique (d'autant plus qu'il traduit mal la richesse comparée en sucres des deux cultures). Toutefois, en regroupant les fruits les plus dégradés des lots 4 A et 15 F du premier essai et 5 A et 15 F du deuxième, on trouve respectivement entre la fermeté et le poids spécifique des coefficients de corrélation $r = -0{,}560$ (S. V.), $r = -0{,}244$ (T. P.) mais seule la première valeur est à la limite de signification ($r\ 0{,}05 = 0{,}576$).

Cette corrélation négative indiquerait une moins bonne tenue au stockage des fruits les plus denses. De plus, la comparaison de ces indices sur les deux lots de fruits frais des deux cultures différentes (confronter fig. 2 et fig. 5) montre que les melons les plus fermes ne sont pas ceux ayant le poids spécifique le plus élevé. Ce caractère est à rapprocher des observations faites sur d'autres légumes fruits dont la Tomate (Anais, 1971).

Pratiquement, la fermeté est la seule mesure qui évolue de façon importante en cours de conservation des melons, avec quelques liens très lâches avec les autres indices étudiés dont les composés pectiques et l'acidité libre. Elle traduit de façon très sensible l'effrondrement des structures de la chair du Melon surmûri et constitue, dans l'immédiat, le meilleur critère pour évaluer la tenue du fruit au stockage.

CONCLUSIONS

Cette étude sur des melons du type « *Cantaloup Charentais* », cv. « *Doublon* », a permis de situer les valeurs moyennes et la variabilité de divers caractères physiques et biochimiques classiques, représentatifs de quelques aspects de la qualité organoleptique et alimentaire, ainsi que commerciale.

Sur le plan de la méthodologie, l'examen des écarts individuels plus ou moins amples selon les indices choisis et la récolte, même dans des conditions de culture relativement bien maîtrisées montre qu'un échantillonnage de six fruits par lot étudié avec des mesures fruit par fruit est un minimum acceptable pour différencier significativement des récoltes et suivre leur évolution. Cette épreuve des conditions analytiques admissibles au niveau des possibilités expérimentales, confirme quelques résultats rapportés par d'autres auteurs (Pratt, 1971) sur des productions d'origines étrangères.

Dans notre expérimentation sur deux cultures différentes, la forme, le poids et la densité du fruit entier n'apparaissent pas comme des indices de qualité valables

en relation suffisamment étroite avec des constituants de la saveur, les sucres plus particulièrement.

L'importance relative du placenta et des graines par rapport à la chair consommable est un facteur défavorable en soi. Mais la formation des graines plus ou moins abondantes peut influer aussi sur la composition de la pulpe du fruit, les métabolismes de la plante étant sollicités différemment.

Les graines représentent jusqu'à 25 p. 100 de l'extrait sec total, d'où l'intérêt des recherches sur la parthénocarpie et la polyploïdie (RISSER, 1969, DUMAS de VAULX, 1974). Un nombre réduit de graines et l'absence d'embryon pourraient être favorables à un meilleur agrément organoleptique.

L'indice réfractométrique est un critère usuel traduisant la richesse totale en diverses substances hydrosolubles de la pulpe, essentiellement les sucres. Sa mesure exige quelques délicates précautions d'échantillonnage. Il diminue faiblement avec le catabolisme intense du fruit et ne varie pratiquement pas au cours des quinze jours de conservation en chambre froide. Cet indice permettrait d'éliminer les mauvais fruits quel que soit le stade de maturité au niveau de la commercialisation.

La détermination des teneurs relatives en saccharose, fructose et glucose permettrait de mieux préciser le potentiel sucrant, réellement perçu par les dégustateurs. De plus, le rapport saccharose/sucres réducteurs ou fructose/glucose restant pourrait constituer une caractéristique de maturité intéressante à étudier sur plusieurs récoltes et divers cultivars.

Les mesures directes de fermeté au pénétromètre constituent le meilleur critère pour suivre les principales dégradations du catabolisme des fruits en cours de conservation; cet indice pourrait éventuellement servir pour prévoir le comportement au stockage d'une récolte.

D'après nos résultats, les composés pectiques, faibles pondéralement, n'apparaissent pas avoir une influence majeure dans la tenue des fruits mûrs. La texture de la chair du melon devrait faire l'objet de recherches orientées vers la fibrosité et les matériaux cellulosiques des parois cellulaires.

L'acidité libre est un facteur pouvant traduire plus ou moins sensiblement la maturation du melon ou son catabolisme. La valeur de cet indice est faible et diffère d'une récolte à l'autre; son intervention dans la saveur du fruit n'est pas évidente et devrait être vérifiée dans une expérimentation plus adaptée. Toutefois, il est possible qu'elle intervienne dans les causes favorisant l'amollissement du fruit au stockage.

La teneur en vitamine C (acide déhydroascorbique) est très différente d'une culture à l'autre, sans que l'on puisse en préciser les causes; les variations de température au niveau de la plante et les conditions d'ensoleillement sous l'abri plastique pourraient être des facteurs favorables.

La couleur de la chair des melons, exprimée par un indice des pigments caroténoïdes, est un critère de qualité visuelle évoluant peu en cours de conservation, mais qui varie de façon très sensible entre fruits et entre cultures.

En définitive, l'indice réfractométrique et la fermeté sont les deux critères les plus commodes et se complétant bien; leur intérêt respectif est confirmé pour traduire d'une part la composition biochimique et d'autre part, l'évolution de qualité du melon pendant la conservation.

Sur un plan pratique, notre étude montre que le melon du type « *Cantaloup Charentais* », cultivé selon des pratiques assez courantes, est un fruit relativement fragile. Il évolue rapidement dès sa récolte, conservé à une température relativement modérée (20 à 25°C). Une diminution sensible de sa qualité apparaît en moins de 4 jours, surtout au niveau de la fermeté, des sucres réducteurs et acidité, en faisant abstraction des modifications probables des arômes, non étudiés dans ce travail.

Par contre, une mise au froid rapide, autour de 4°C seulement suffit pour assurer un bon maintien des caractéristiques initiales d'un fruit cueilli convenablement mûr, pendant plus de quinze jours; le ramollissement du fruit est encore sensible, mais non excessif sur le plan gustatif.

Récemment, KAUR, NANDPURI et LAL (1975) ont suivi l'évolution des fruits de quatre variétés cultivées aux Indes, conservés à + 1°C et à température ambiante. Leurs résultats confirment les nôtres sur l'évolution des sucres totaux, de l'acidité, de la vitamine C notamment. Ils considèrent aussi que les fruits de ces cultivars sont incommercialisables après deux jours de conservation à température ambiante et que par contre, le stockage à basse température permet de les garder pendant deux à trois semaines.

Sur un plan technologique, ces observations posent le problème des techniques de refroidissement rapide; les moyens frigorifiques classiques peuvent être insuffisants ou intervenir trop tard pour des récoltes en ambiance chaude (serres) ou sur des cueillettes estivales de plein champ. Les procédés de refroidissement précoces par bain froid (« hydrocooling ») utilisés de façon fréquente sur des productions américaines, devraient être vulgarisés dans nos régions, au niveau d'une politique d'amélioration générale de la qualité.

Reçu pour publication en novembre 1976.

SUMMARY

BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS, QUALITY AND STORAGE OF MELONS (C. V. DOUBLON, CANTALOUP CHARENTAIS TYPE) HARVESTED IN GREENHOUSE

The evolution of the quality of melons (c. v. « Doublon », Cantaloup Charentais type) harvested at maturity and stored at room temperature (22-25°C) during 2 and 4 days or at + 4°C during 1 and 2 weeks, was compared. This study has been made twice: with fruits harvested first in a warmed glasshouse in winter, and then in a plastic greenhouse in spring. In each trial the fruits are issued from a single harvest.

The physical and organoleptic characteristics measured were : shape, specific gravity, weight and firmness of the flesh, contents of sugars, acids, pectic substances, carotenoïds, dehydroascorbic acid. Mean values and variability were made on samples of six fruits by treatment.

The percentage of soluble solids, measured with a refractometer, and the flesh firmness, measured with a penetrometer, are two characteristics suitable for a breeding program to improve the fruit quality or to choose marketable fruits.

An early cooling at + 4°C is sufficient to keep good qualities of mature harvested fruits during more than one week.

RESUMEN

CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS, CALIDAD Y APTITUD PARA LA CONSERVACION DE MELONES (CANTALOUP CHARENTAIS, CV. DOUBLON) CULTIVADOS EN INVERNADEROS

Se ha estudiado la evolucion de la calidad de los frutos del cultivar de melones « *Doublon* » (tipo « *Cantaloup Charentais* ») cosechados a su madurez, conservandolos a la temperatura

ambiente (22-25°C) y en frio (+ 4°C). Este estudio ha sido realizado sobre dos lotes distintos de frutos : uno procedente de un cultivo invernal en invernaderos de vidrio calentados y el otro en un cultivo en invernadero de plastico tipo tunel al final de la primavera.

Los indices organolépticos y alimentarios considerados han sido : la densidad, forma, peso de la pulpa que se puede consumir, azucares, acidos, sustancias pépticas, carotenoides y la vitamina C. Estos diferentes indices han sido analizados fruto por fruto. Se han comparado los valores medios y las variabilidades de los lotes de 6 frutos.

El porcentaje de materias secas solubles medida en el refractometro y la consistencia de la pulpa, medida en el penetrometro, son dos criterios que han resultado ser validos para la seleccion de las variedades y para la realizacion de una clasificacion de los frutos aceptables por el consumidor.

Una refrigeracion precoz de aproximadamente + 4°C ha demostrado ser suficiente para mantener durante mas de una semana una buena calidad de los frutos cosechados en su madurez.

RIASSUNTO

CARATTERI BIOCHIMICI, QUALITA E ATTITUDINE ALLA CONSERVAZIONE DEI MELONI (DOUBLON, tipo CANTALOUP CHARENTAIS) COLTIVATI IN SERRA

L'oggetto dello studio è l'evoluzione della qualità di meloni « Doublon » (tipo « Cantaloup Charentais ») raccolti maturi. Essi sono stati ossservati durante la loro conservazione alla temperatura ambiente (22-25°C) e a freddo (+ 4°C). Per l'esperimento sono stati scelti due tipi di frutto distinti : uno proveniente da una coltura invernale in serra di vetro riscaldata, l'altro da una coltura in serra tunnel in plastica a fine primavera.

Gli indici organolettici e alimentari considerati sono : densità, forma, calibro, peso della polpa commestibile, zuccheri, acidi, sostanze pectiche, carotenoidi, vitammina C. Questi indici sono stati analizzati frutto per frutto e sono stati confrontati poi i valori medi e le variabilità presentate dal lotto di 6 frutti.

La percentuale di materie asciutte solubili misurata al rifrattometro e la compattezza della polpa misurata al penetrometro, sono due criteri che si sono rivelati validi per la selezione delle varietà e per fare una scelta dei frutti accettabili per il consumo.

Per mantenere durante più di una settimana una buona qualità dei frutti raccolti al loro stadio di maturità, è stata sufficiente una refrigerazione precoce di circa + 4°C.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anais G., 1971. Recherche d'une méthode pratique de sélection pour la fermeté du fruit chez la Tomate. *Ann. Amélior. Plantes*, **21** (2), 169-178.

Angiboust A., 1971. Connaissance et amélioration des qualités gustatives du Melon. *Revue Horticole*, (2304), 2179-2183.

Aubert S., 1971. L'Aubergine (*Solanum melongena L.*). I. Composition et facteurs de qualité. *Ann. Technol. Agric.*, **20** (3), 241-264.

Aubert S., Dumas de Vaulx R., 1977. Test de fermeté non destructif du Melon. Note en préparation pour les *Ann. Technol. Agric.*

Aulenback B. B., Worthington J. T., 1974. Sensory evaluation of muskmelon : is soluble solid content, a good quality index. *Hortscience*, **9** (2), 136-137.

Bianco V. V., 1969. M. S. Thesis. University of California, Davis. (Cité par Pratt H. K. 1971).

Davis R. M. Jr., Baker G. A., Wasmire R. F., 1964. Muskmelon quality characteristics. Their variability and interrelationships. *Hilgardia*, **35**, 479-489.

Dumas de Vaulx R., 1974. Utilisation de la polyploïdie dans l'amélioration du Melon. *Ann. Amélior. Plantes*, **24** (4), 389-403.

Kaur G., Nandpuri K. S., Lal T., 1975. A comparative study of some chemical constituents and organoleptic attributes during storage of muskmelon (Cucumis melo L.). *Indian Food Packer* **29** (5), 21-24.

Kemp T. R., Knavel D. E., Stoltz L. P., 1971. Characterics volatile Cucumis melon components. *Phytochemistry*, **10** (8), 1925-1928.

KEMP T. R., KNAVEL D. R., STOLTZ L. P., 1974. Volatile cucumis melo components : identification of additional compounds and effets of storage conditions *Phytochemistry*, **12** (12), 2921-2924.

KEMP T. R., STOLTZ L. P., KNAVEL D. E., 1972. Volatile components of muskmelon fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 196-198.

NIP W. K., BURNS E. E., PATERSON D. R., 1968. Physical, chemical and organoleptic attributes of « charleston gray » watermelon at different stages of maturity. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, **93**, 547-551.

MACKEY A. C., HARD M. M., ZAEHRINGER M. V., 1973. Measuring textural characteristics of fresh fruits and vegetables, apples, carrots, cantaloupe. *Agric. Experim. Station Oregon State University. Tech. Bull.*, 123, 39 p.

OURNAC A., 1965. Étude du dosage de l'acide ascorbique dans les vins et les jus fortement colorés. *Ann. Technol. Agric.*, **14** (4), 341-347.

OURNAC A., 1966. Corps interférants dans le dosage de l'acide ascorbique par la dinitrophényl hydrazine dans les jus de raisin et les vins. *Ann. Technol. agric.*, **15** (1), 113-125.

PRATT H. K., 1971. The biochemistry of fruit and their products, Chap. 5 : Melons. *Hulme A. C. Edit., Academic Press, New York, London*, **2**, 207-232.

RISSER G., RODE J. C., 1969. Effet de quelques substances de croissance sur la fructification du Melon (*Cucumis melo* L.). *Ann. Physiol. Vég.*, **11** (4), 359-371.

TEMKIN-GORODEISKI N., AHARONI Y., ZISMAN U., 1975. L'influence de la saison de culture et du mode d'irrigation sur la maturation de melons de la variété Honeydew Amid. *Colloques internationaux du C. N. R. S. : facteurs et régulation de la maturation des fruits*, **238**, 93-96.

THIAULT J., 1970. Études de critères objectifs de la qualité gustative de pommes golden delicious. *Bull. techn. Inf.*, **248**, 201-291.

SHOWALTER R. K., 1961. Specific gravity, weight and solids relationships in watermelons. *Proc. Florida State Hort. Sci.*, **74**, 268.

ULRICH R., 1952. La vie des fruits. Edit. Masson, Paris, 365 p.

ULRICH R., 1954. La conservation par le froid des denrées d'origine végétale (Encyclopédie du froid). Libr. J. B. Baillère Paris-6e.

ZISMAN U., TEMKIN-GORODEISKI N., 1975. A technique for measuring the rate of CO_2 and ethylene production of melon fruits on the plant. *Hortscience*, **10** (4), 425-426.

ZUANG H., 1973 à 1975. Comptes-rendus du groupe de travail « Qualité des légumes frais ». *Rapports I. N. V. U. F. L. E. C.*, Paris.

WIERMSA O., BUITELAAR K., 1975. Kwaliteits en rijpheidscriteria van meloenen (criteria for quality and ripeness in melons). *Bedrijfsontwijkkeling* **6** (1), 75-78.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (4), 337-342.

RECHERCHE ANALYTIQUE DE LA BÉTAÏNE DANS LES VINS

P. DUBOIS * et Ph. SIMAND

* *Station de Technologie des Produits végétaux,*
Centre de Recherches de Dijon I. N. R. A.,
7, rue Sully - B.V. 1540
21034 Dijon Cedex

RÉSUMÉ

On propose une nouvelle méthode d'analyse quantitative de la bétaïne dans les vins. L'ester butylique du chlorure de bétaïne est dégradé thermiquement à 165°C, et les composés volatils qui se forment sont analysés par chromatographie en phase gazeuse.

Cette méthode pourrait être utilisée pour contrôler l'addition de sucre de betterave dans les jus de raisin avant fermentation, mais la bétaïne est présente dans ces jus à des teneurs très supérieures à celles que nous avions supposées.

Mots clefs : *analyse, bétaïne, vin, chaptalisation.*

La chaptalisation est une opération qui consiste à ajouter du saccharose lors de la fermentation alcoolique du moût de raisin pour en corriger les insuffisances de maturité. Dans les pays de la Communauté Économique Européenne, cette pratique est réglementée, mais aucune méthode analytique ne permet de la contrôler *a posteriori*. Diverses tentatives ont été faites pour rechercher, dans les vins, les impuretés organiques du sucre de betterave, notamment celles qui ne se recontrent pas dans le raisin et qui ne sont pas modifiées par la fermentation alcoolique. L'une de ces impuretés, la bétaïne, semble intéressante puisque, par des techniques il est vrai peu sensibles, CENCI et CREMONINI (1973), puis CHAUVET et SUDRAUD (1975), ne la détectent pas dans les vins non chaptalisés.

Nous avons donc entrepris la mise au point d'une méthode de dosage de traces de bétaïne, en nous inspirant du principe proposé par DUBOIS et DUPUY (1974) qui transforment la bétaïne en un composé volatil pour mettre à profit la grande sensibilité des détecteurs de chromatographie en phase gazeuse. Cette transformation se

fait par dégradation thermique de l'ester butylique de la bétaïne, selon les réactions d'Hoffmann inversées :

$$(CH_3)_3{\equiv}\overset{\displaystyle Cl}{\overset{|}{N}}{-}CH_2{-}COOC_4H_9$$

$$\xrightarrow{1} CH_3{-}Cl + (CH_3)_2 = N{-}CH_2{-}COOC_4H_9$$

et/ou

$$\xrightarrow{2} (CH_3)_3{\equiv}N + Cl{-}CH_2{-}COOC_4H_9$$

Tous ces composés sont volatils, mais celui qui est finalement le plus simple à rechercher est le N, N-diméthyl glycocolate de butyle qui est bien séparé du chlorure de méthylène, solvant utilisé pour reprendre ces composés et les injecter dans le chromatographe en phase gazeuse. Le N, N-diméthyl glycocolate de butyle peut être utilisé pour le dosage de la bétaïne, à condition d'utiliser un étalon interne qui se comporte comme elle à tous les stades de l'analyse. On a choisi la méthyl-2 bétaïne qui n'a pas été signalée à l'état naturel et qui donne naissance à l'ester butylique de la N, N-diméthyl α-alanine par la même série de réactions.

MÉTHODE

Isolement des bétaïnes

A 100 ml de moût ou de vin, on ajoute 0,15 mg de méthyl-2 bétaïne et on concentre à 50 ml dans un évaporateur rotatif sous vide à 80°C. La bétaïne et la méthyl-2 bétaïne sont ensuite isolés sur deux colonnes de résines échangeuses d'ions (LEWIS, 1966 et ROGERS, 1970).

— La première colonne contient 100 ml de résine Amberlite IR 120 (H+). L'échantillon y est passé au débit de 3ml/minute, puis la colonne est rincée avec de l'eau distillée au même débit et jusqu'à neutralité de l'éluat. Dans le cas des vins doux et des moûts, il convient de laver cette colonne par plusieurs litres d'eau pour éliminer totalement les sucres.

Les composés aminés sont ensuite élués par 300 ml de NH_4OH à 2 % et la colonne est rincée par 200 ml d'eau. Cet éluat est concentré sous vide jusqu'à un volume de 50 ml et est ramené à pH 7 à l'aide d'une solution d'HCl 0,1 N.

La résine de cette colonne est très chargée en matières colorantes et n'est pas réutilisable.

— La deuxième colonne contient 100 ml du mélange de deux résines :

2/3 d'Amberlite IRA 400 (OH^-)
1/3 d'Amberlite IRC 50 (H^+)

Ce mélange de résines retient la plupart des composés aminés, sauf la bétaïne et la méthyl-2 bétaïne. L'éluat de la première colonne y est passé au débit de 1 ml/minute, et 100 ml d'eau assurent l'élution des bétaïnes.

Ce mélange de résines n'est pas réutilisable.

Préparation des esters butyliques

L'éluat obtenu est concentré sous vide, puis le résidu est séché dans un tube en verre destiné à être scellé. Ce tube est placé dans un bloc chauffant à 60°C, et l'évaporation totale de l'eau est assurée par un courant d'azote gazeux et l'addition de petites quantités de chlorure de méthylène. Au résidu sec, on ajoute 1,5 ml de n-butanol HCl 3 N (ROACH et GEHRKE, 1969). On scelle le tube et on le porte dans un générateur d'ultra-sons pour faciliter la solubilisation des bétaïnes. Ce tube est ensuite placé à l'étuve à 100°C pendant une heure.

Dégradation thermique et dosage

On évapore alors le butanol à sec à 60°C et on scelle à nouveau le tube. On le porte à l'étuve à 165°C pendant 55 minutes. Les composés volatils formés sont repris par 50 microlitres de

chlorure de méthylène, dont un microlitre est analysé par chromatographie en phase gazeuse dans les conditions suivantes :

— colonne d'acier inoxydable de 3 m de long et 3 mm de diamètre intérieur, remplie de Chromosorb W 80-100 mesh imprégné de Dexsil à 5 %,

— température du four 115°C,

— détecteur à ionisation de flamme.

On mesure le rapport des surfaces des pics des esters butyliques du N, N-diméthyl glycocole et de la N, N-diméthyl α-alanine, et on calcule la teneur en bétaïne en se rapportant à une droite d'étalonnage. Cette droite est obtenue à l'aide de solutions contenant 0,15 mg de méthyl-2 bétaïne et des quantités croissantes de bétaïne qui sont traitées selon le mode opératoire complet décrit ci-dessus.

Justifications de certains points de la méthode

La méthyl-2 bétaïne a été synthétisée par action de l'iodure de méthyle sur l'α-alanine en solution dans le méthanol, GRIGNARD (1950). Elle a ensuite été isolée sur les mêmes résines que celles utilisées pour l'isolement de la bétaïne.

Le chlorure de l'ester butylique de la méthyl-2 bétaïne se décompose thermiquement comme celui de l'ester butylique de la bétaïne :

$$(CH_3)_3 \equiv \overset{\overset{\displaystyle Cl}{|}}{N} - \underset{\underset{\displaystyle CH_3}{|}}{CH} - COOC_4H_9$$

$$\xrightarrow{1} CH_3Cl + (CH_3)_2 = N - \underset{\underset{\displaystyle CH_3}{|}}{CH} - COOC_4H_9$$

et/ou

$$\xrightarrow{2} (CH_3)_3 \equiv N + \underset{\underset{\displaystyle CH_3}{|}}{Cl - CH} - COOC_4H_9$$

L'ester butylique de la N, N-diméthyl α-alanine est bien séparé de celui du N, N-diméthyl glycocole par chromatographie en phase gazeuse (fig. 1).

La température de dégradation commençante semble un peu plus élevée pour le dérivé de la méthyl-2 bétaïne que pour celui de la bétaïne. Aussi avons nous fait des essais à diverses températures sur un même mélange de chlorures d'esters butyliques de bétaïne et de méthyl-2 bétaïne. Le rapport des surfaces des pics chromatographiques des esters butyliques des N, N-diméthyl glycocole et α-alanine reste constant aux températures voisines de 165°C (fig. 2), et il ne risque pas d'être significativement modifié par de faibles variations de celle-ci. La température de 165°C a donc été adoptée dans la méthode.

Un essai semblable a permis de fixer la durée du chauffage à 55 minutes (fig. 3).

Par ailleurs, les matières colorantes des vins gênent l'isolement de la bétaïne et de la méthyl-2 bétaïne. C'est pourquoi nous proposons d'opérer à chaque fois sur des résines neuves. Des essais de décoloration par le noir animal ou de défécation par le sous-acétate de plomb nous ont donné des résultats aberrants. Au cas où l'éluat de la deuxième colonne serait encore coloré, il suffirait de le repasser sur une nouvelle colonne du second type.

RÉSULTATS ET CONCLUSION

La méthode exposée ici semble donner toutes satisfactions, puisqu'elle permet de doser la bétaïne à des teneurs de l'ordre de quelques mg/l avec une erreur inférieure à 10 %. Son inconvénient majeur est d'être très longue.

Par ailleurs, nous avons analysé les moûts de cinq cépages de raisin *(Vitis vinifera)*, et nous y avons trouvé des quantités non négligeables de bétaïne :

— 0,7 mg/l pour un moût de Riesling et un moût d'Aramon,

— 1,6 mg/l pour un moût de Carignan et un moût de Cabernet-Sauvignon,

— 1,8 mg/l pour un moût de Maccabeu.

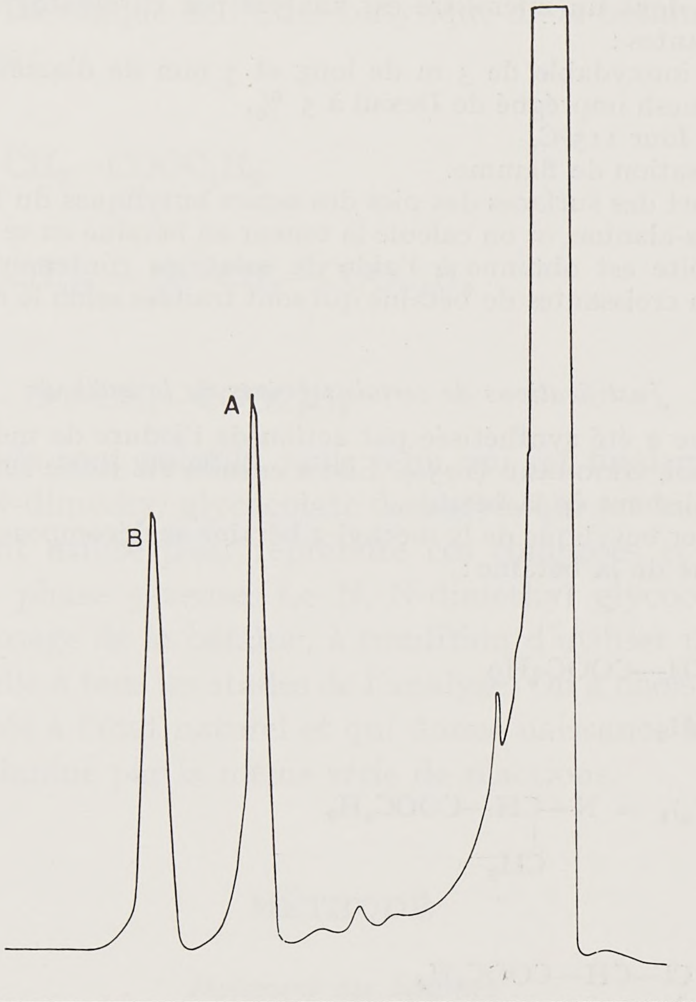


FIG. 1. — *Type d'enregistrement chromatographique obtenu dans les conditions indiquées dans le texte.* Les pics A et B correspondent aux esters butyliques de la N, N-diméthyl glycine (A) et de la N, N-diméthyl α-alanine (B).

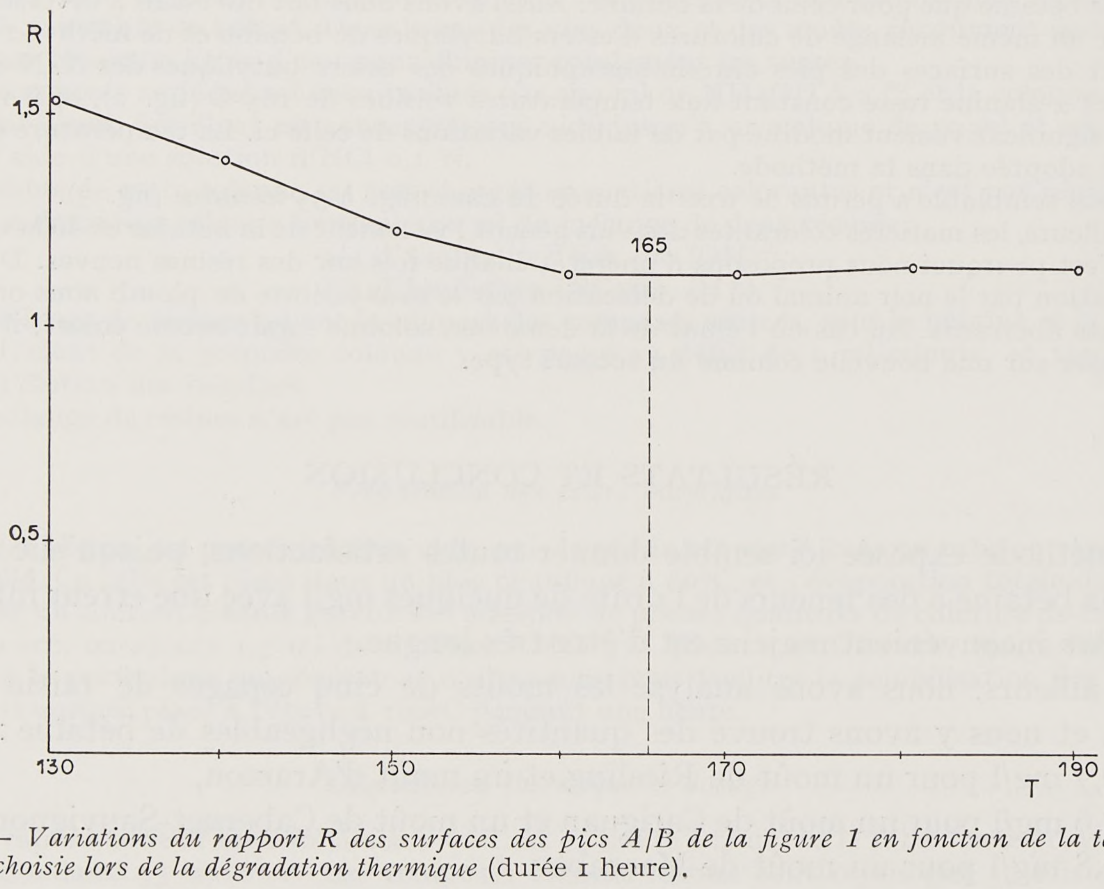


FIG. 2. — *Variations du rapport R des surfaces des pics A/B de la figure 1 en fonction de la température* (°C) *choisie lors de la dégradation thermique* (durée 1 heure).

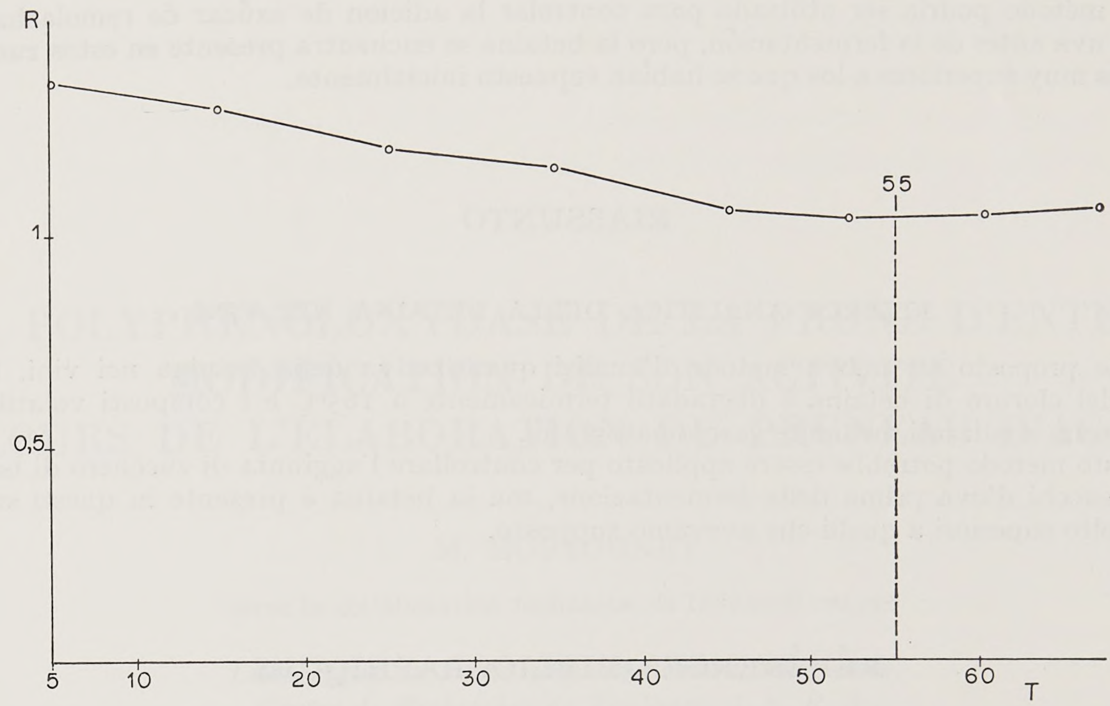


FIG. 3. — *Variations du rapport R des surfaces des pics A/B de la figure 1 en fonction de la durée* (en minutes) *de la dégradation thermique à 165°C.*

Enfin, nous avons trouvé une teneur en bétaïne de 3,5 mg/l pour un vin de Carignan, soit deux fois plus que dans le moût du même cépage. Nous avons donc fait quelques essais préliminaires de fermentation d'un milieu de culture ne contenant pas de bétaïne (« Yeast nitrogen base » - Difco), et nous avons constaté que ni *Saccharomyces cerevisiae,* ni *Saccharomyces bayanus,* ne relarguent de la bétaïne dans le milieu.

Les teneurs naturelles des jus de raisin et des vins en bétaïne rendent difficiles le contrôle analytique des chaptalisations modérées par le sucre de betterave. Mais il semble possible d'envisager un contrôle des chaptalisations nettement abusives.

Reçu pour publication en septembre 1976.

SUMMARY

QUANTITATIVE ANALYSIS OF BETAINE IN WINES

A new method is proposed for the quantitative analysis of betaïne in wines. The chloride of the butyl ester of betaïne is degradated thermicaly at 165°C, and the volatil compounds which are formed are analysed by gas chromatography.

This method could be used to control the addition of beet sugar to grape juices before fermentation, but betaïne is present in grape juices at much higher levels than it was expected.

RESUMEN

INVESTIGACION ANALITICA DE LA BETAINA EN LOS VINOS

Se propone en este artículo un nuevo método de análisis de la betaina en los vinos. El éster butílico del cloruro de betaina es degradado térmicamente a 165°C y los compuestos volátiles que se forman son analizados por cromatografía en fase gaseosa.

Este método podría ser utilizado para controlar la adicion de azúcar de remolacha en los zumos de uva antes de la fermentación, pero la betaina se encuentra presente en estos zumos con contenidos muy superiores a los que se habían supuesto inicialmente.

RIASSUNTO

RICERCA ANALITICA DELLA BETAINA NEI VINI

Viene proposto un nuovo metodo d'analisi quantitativa della betaina nei vini. L'estere butilico del cloruro di betaina è degradato termicamente a 165°C e i composti volatili che si formano sono analizzati mediante gascromatografia.

Questo metodo potrebbe essere applicato per controllare l'aggiunta di zucchero di barbabietola nei succhi d'uva prima della fermentazione, ma la betaina è presente in questi succhi in tenori molto superiori a quelli che avevamo supposto.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Cenci P., Cremonini B., 1973. La zuccheraggio del vino c. modifice al metodo di recherco delle agianto di zucchero di bietola. *Riv. Vitic. Enol.*, **26**, 194-198.

Chauvet S., Sudraud P., 1975. La recherche de la chaptalisation des vins par la détection de la bétaïne. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **1**, 35-41.

Dubois P., Dupuy P., 1974. Recherche analytique de la bétaïne dans un jus de raisin. *C. R. Acad. Agriculture de France*, 62-67.

Grignard V., 1950. Traité de Chimie Organique. Masson et Cie Ed. (Paris).

Lewis W.M., 1966. Chemical evaluation of orange juice in compounded soft drinks. *J. Sci. Food Agric.*, **17**, 316-320.

Roach D. et Gehrke W., 1969. Direct esterification of protein amino acids. Gas liquid chromatography of N TFA n butyl esters. *J. Chromatogr.*, **44**, 269.

Rogers G.R., 1970. Collaborative study of betaïne in orange juice. *J. of A.O.A.C.*, **53**, 568-571.

Ann. Technol. agric., 1976 **25**, (4), 343-356.

LA POLYPHENOLOXYDASE DE LA PRUNE D'ENTE (1) MODIFICATION DE SON ACTIVITÉ AU COURS DE L'ÉLABORATION DU PRUNEAU D'AGEN (1)

M. MOUTOUNET

avec la collaboration technique de Hélène MONDIES

Laboratoire de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches de Toulouse, I. N. R. A.,
B. P. 12 31320 Castanet-Tolosan

RÉSUMÉ

L'activité polyphénoloxydasique d'extrait enzymatique de prunes et de pruneaux a été mesurée par une méthode colorimétrique. Les propriétés générales d'extraits bruts de polyphénoloxydase (PPO) de la prune d'Ente ont été déterminées. La dénaturation thermique de la PPO au cours de l'obtention du pruneau dépend de la technique de séchage pratiquée. L'importance technologique des résultats obtenus est discutée.

I. — INTRODUCTION

En solution modèle SANDERSON *et al.* (1971) ont déterminé les conditions pour lesquelles le β carotène engendre des composés volatils. Au cours de l'élaboration du thé noir, ils pensent que les flavanols, oxydés par l'action d'une catécholoxydase, sont des agents d'oxydations qui entraînent la dégradation des caroténoïdes. SANDERSON et GRAHAM (1973) soulignent l'importance de l'activité catécholasique sur les transformations biochimiques de la « fermentation » du thé et sur la formation de l'arôme du thé noir.

La transformation de la prune en pruneau entraîne une nette diminution des pigments caroténoïdes de la prune (MOUTOUNET, 1975) et un appauvrissement en

(1) Prunus domestica var. d'Ente. Le pruneau est obtenu par déshydratation partielle de la prune d'Ente.

composés phénoliques orthodihydroxylés (MOUTOUNET, 1976). Parmi les constituants volatils du pruneau on note la présence de composés qui peuvent avoir comme précurseurs, des caroténoïdes (MOUTOUNET *et al.*, 1975).

En conséquence, il a paru intéressant de savoir si la prune d'Ente possédait une polyphénoloxydase et de spécifier les conséquences de la présence d'activité polyphénoloxydasique sur la technologie propre à l'élaboration du pruneau.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Préparation des échantillons d'analyse*

La provenance, le mode de prélèvement et de préparation des échantillons ont été déjà mentionnés (MOUTOUNET et JOURET, 1975, MOUTOUNET, 1975).

Des prunes de la récolte 1975, après triages densimétriques (1 090-1 100) sont placées dans une étuve de laboratoire ventilée. Des lots sont traités à 54, 74 et 90°C. Des prélèvements de 25 fruits sont effectués au bout d'une heure, deux heures, et trois heures de séjour à l'étuve. Les fruits dénoyautés sont broyés congelés. Ces échantillons sont lyophilisés et conservés jusqu'au moment de l'analyse, à — 40°C.

B. — *Méthodes analytiques*

L'extrait enzymatique est préparé à partir de la poudre lyopholisée de fruit, la polyphénoloxydase est extraite par un tampon phosphate monopotassique-phosphate disodique 0,1 M de pH 7,5, en présence de polyéthylène glycol et de polyvinylpyrrolidone selon les indications de BARTHE (1972).

La méthode colorimétrique, proposée par PONTING et JOSLYN (1948), est utilisée selon le protocole décrit par BARTHE (1972) pour la mesure de l'activité polyphénoloxydasique. Le pyrocatéchol (dihydroxy-1,2 benzène) est employé comme substrat. La vitesse de la réaction est enregistrée à l'aide d'un spectrophotomètre Pye Unicam 1 800. La cuve témoin reçoit la solution de substrat et l'extrait enzymatique chauffé à 90°C pendant 5 minutes. Les densités optiques sont prises après une minute de réaction. L'activité de la polyphénoloxydase est exprimée en variation de densité optique par minute et par gramme de matière sèche de pulpe de fruit.

C. — *Détermination des propriétés de l'extrait enzymatique*

Influence du pH sur l'activité de la PPO de la prune d'Ente.

Les solutions de pyrocatéchol à 0,033 M dans les tampons à pH 5, 5,5 et 6 ne sont pas stables et ont tendance à brunir rapidement. Aussi la technique analytique utilisée pour déterminer le pH optimal de l'activité de l'enzyme a été modifiée. Cinq cents microlitres de solution aqueuse de pyrocatéchol à 0,2 M sont ajoutés, juste avant l'addition de l'extrait enzymatique, à 2,5 ml de tampon de Mc Ilvaine.

Étude de la spécificité de la PPO de la prune d'Ente.

Pour remédier au manque de solubilité de certains composés polyphénoliques soumis à l'action de l'enzyme, les teneurs expérimentées sont de 3×10^{-4} M.

Influence de la température sur la PPO de la prune d'Ente.

Pour déterminer l'influence de la température sur la vitesse de la réaction, les solutions tampon de pyrocatéchol sont placées dans des tubes à hémolyse et portées au bain-marie jusqu'à ce que la température désirée soit atteinte. Cent microlitres d'extrait enzymatique sont alors ajoutés et on laisse agir pendant une minute. La réaction enzymatique est arrêtée par addition de 200 microlitres d'une solution d'acide trichloroacétique à 18 %.

L'étude de la dénaturation thermique de l'enzyme est réalisée avec des solutions d'extrait enzymatique portées aux températures testées dans des tubes à essais. Des prélèvements sont effectués à espaces réguliers et l'activité résiduelle est mesurée en fonction du temps au pH de la prune à maturité.

III. — RÉSULTATS

A. — *Effet de la méthode d'extraction sur la mesure de l'activité polyphénoloxydasique*

— Diverses méthodes d'extractions ont été décrites dans la littérature pour essayer de minimiser la dénaturation de la PPO, résultant de l'oxydation des phénols. L'extraction pratiquée selon le protocole proposé par BARTHE (1972) avec des proportions de 4,5 g de polyclar AT pour 5 g de matériel végétal lyophilisé entraîne l'obtention de préparations enzymatiques colorées attestant que les polyphénols ne sont pas totalement fixés et que leur oxydation enzymatique a débuté dès l'extraction de la PPO de la prune. Les extraits enzymatiques qui ne brunissent pas sont obtenus par la mise en œuvre de 500 mg de produits lyophilisés ; à cette teneur l'activité enzymatique mesurée est la plus élevée (tabl. 1). KAHN (1975) a remarqué,

TABLEAU I

Influence de la quantité de matériel végétal sur l'activité enszymatique
(Chaque échantillon est additionné de 4,5 g de polyclar AT et de 1 g de polyéthylène glycol)

Quantité de matériel végétal traité (grammes)	Δ DO . mn^{-1} . g^{-1} MS
0,5	32,9
1,0	30,8
2,5	28,6
5,0	14,0

également, que l'addition de polyclar AT à un taux de 1/1 a un faible effet sur l'activité de l'extrait de PPO de différentes variétés d'avocat tandis que l'addition d'un large excès de polyclar (5 pour 1) entraîne une augmentation de 35 à 50 % de l'activité spécifique selon la variété d'avocat.

— Les variations des mesures d'activité enzymatique en fonction de la nature des polyvinylpyrrolidones testées sont faibles (± 8 %) (tabl. 2). Les surnageants obtenus avec les PVP solubles sont légèrement colorés en brun.

TABLEAU 2

Extraction de la PPO de la prune d'Ente en fonction de la nature des polyvinylpyrrolidones.
(Addition de 4,5 g de polyvinylpyrrolidone à 500 mg de pulpe de fruits lyophilisée)

Polyvinylpyrrolidone	Δ DO . mn^{-1} . g^{-1} MS
Polyclar AT	32,9
PVP 2500-3000	30,1
PVP K 30	31,5

— La première extraction par 70 ml de tampon phosphate monopotassique-phosphate disodique solubilise 80 % de l'enzyme (tabl. 3). Afin de ne pas diluer l'extrait enzymatique une seule extraction est pratiquée. Après trois extractions

TABLEAU 3

Influence de la centrifugation sur la mesure de l'activité enzymatique
(Résultats exprimés en variation de densité optique par minute et par gramme de matière sèche)

Préparation enzymatique (échantillon lyophilisé, mis en suspension dans le tampon à pH 7,5 et centrifugé à 5 500 g)	32,9
2^e centrifugation (remise en suspension dans du tampon à pH 7,5 et centrifugation à 5 500 g)	6,5
3^e centrifugation (nouvelle mise en suspension dans du tampon à pH 7,5 et centrifugation à 5 500 g)	1,8
Préparation enzymatique centrifugée à 38 000 g	32,2
Préparation enzymatique centrifugée à 105 000 g	30,8

successives, la mise en contact pendant une heure de solution de tween 80 à 2 % dans le tampon à pH 7,5, avec le culot de centrifugation, n'entraîne pas une nouvelle solubilisation d'enzyme. D'autre part, après centrifugation à plus haute vitesse sur la préparation enzymatique brute, la quasi-totalité de l'activité enzymatique se retrouve dans le surnageant (tabl. 3). Le broyage des fruits à l'état congelé conduit à une désorganisation des structures cellulaires et les résultats obtenus correspondent, en conséquence, à l'activité de l'enzyme solubilisée.

Le protocole d'extraction suivant a été arrêté : 500 mg d'échantillon lyophilisé est additionné de 4,5 g de polyclar AT (préalablement traité à l'HCl à 10 %) et de 1 g de polyéthylène glycol. L'ensemble est agité pendant une heure dans le tampon phosphate monopotassique-phosphate disodique 0,1 M de pH 7,5, puis centrifugé à 5 500 g pendant 15 minutes et filtré sous pression d'azote afin d'éliminer les particules en suspension. Ces manipulations sont effectuées à 4°C.

B. — *Propriétés générales de la PPO de la prune d'Ente*

Les propriétés de l'enzyme ont été déterminées, soit en fonction de leur utilité pour optimiser les mesures de l'activité de l'enzyme, soit en raison de leur importance vis à vis de la technologie du pruneau.

Cinétique de la réaction enzymatique.

Une diminution rapide de la vitesse de réaction est observée lorsque l'enzyme agit sur le pyrocatéchol. La vitesse reste linéaire pendant une minute (fig. 1). Un temps de latence important précède l'oxydation du p. crésol. La cinétique d'oxydation de la 3-4 dihydroxyphénylalanine (DOPA) et de la catéchine sont linéaires pendant une période plus longue que dans le cas du catéchol ou de l'acide chlorogénique. L'inactivation de l'activité catécholoxydasique et le temps de latence observé lors de l'oxydation des monophénols sont des phénomènes caractéristiques

(KUBOWITZ, 1937). La PPO de la prune se comporte donc, à ce titre, comme les autres polyphénoloxydases.

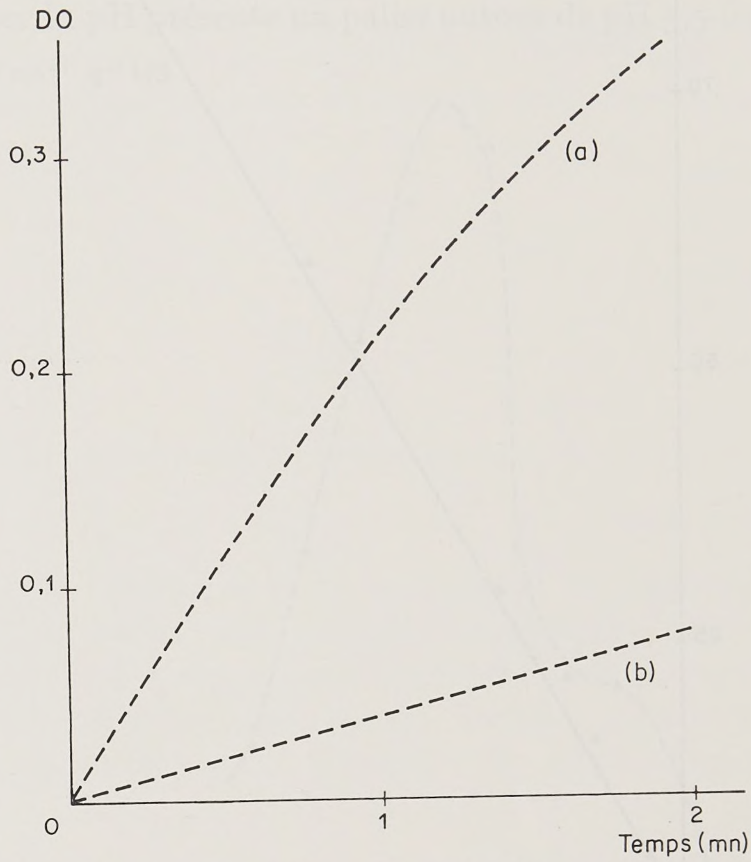


FIG. 1. — *Cinétique de la réaction enzymatique*

(a) Dihydroxy-1,2 benzène (λ = 400 nm).
(b) Dihydroxyphénylalanine (λ = 470 nm).
(Au temps zéro, la cuve du spectrophotomètre renferme 100 µl de préparation enzymatique, et 2,9 ml de solution de substrat à 33×10^{-3} M dans le tampon phosphate-acide citrique à pH 4,25.)

Influence de la concentration en enzyme.

L'étude de l'influence de la concentration en enzyme sur la mesure de l'activité a été réalisée avec ces doses croissantes de préparation enzymatique. Dans les limites indiquées, la quantité d'enzyme mise en jeu est proportionnelle à la vitesse de réaction (fig. 2).

Influence de la concentration en substrat.

Avec une préparation enzymatique brute la courbe de la vitesse de réaction en fonction de la concentration en pyrocatéchol est conforme à l'équation de Michaelis-Menten (fig. 3). La valeur du Km apparent déterminé par la méthode graphique de LINEWEAVER et BURK est de $13 . 10^{-3}$ M. Cette valeur est voisine de celle trouvée par LUH et PHITHAKPOL (1972) à partir d'extrait brut de pêches. Avec des solutions enzymatiques purifiées les auteurs trouvent en général pour les fruits, des valeurs plus faibles : $6,8 . 10^{-3}$ M pour l'avocat (DIZIK et KNAPP, 1970) et $2, 6 . 10^{-3}$ M pour la banane (PALMER, 1963).

Influence du pH.

Dans le tampon phosphate disodique-acide citrique le maximum d'activité est obtenu à pH 4,25. Au pH de la prune l'activité mesurée est inférieure de 10 %

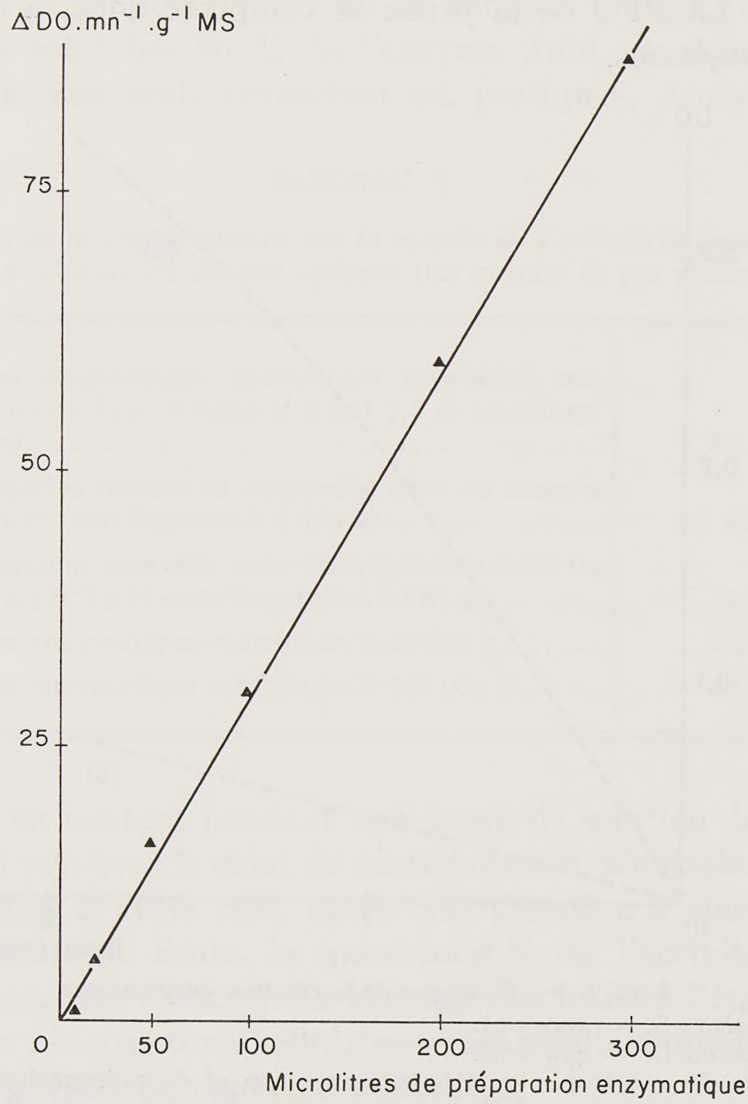


FIG. 2. — *Influence de la concentration en enzyme sur l'activité enzymatique*

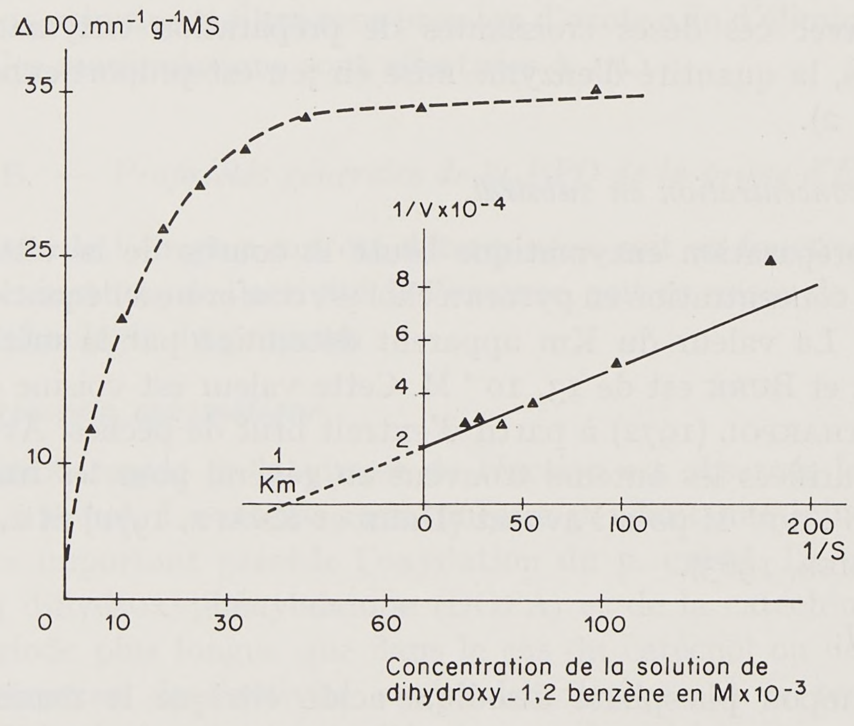


FIG. 3. — *Influence de la concentration en substrat sur la vitesse de la réaction enzymatique*

par rapport à l'optimum (à maturité la prune d'Ente a un pH voisin de 3,8). La PPO de la prune d'Ente n'a pratiquement plus d'activité en milieu neutre. La courbe d'activité en fonction du pH présente un palier autour de pH 5,5-6 (fig. 4). Ce résultat

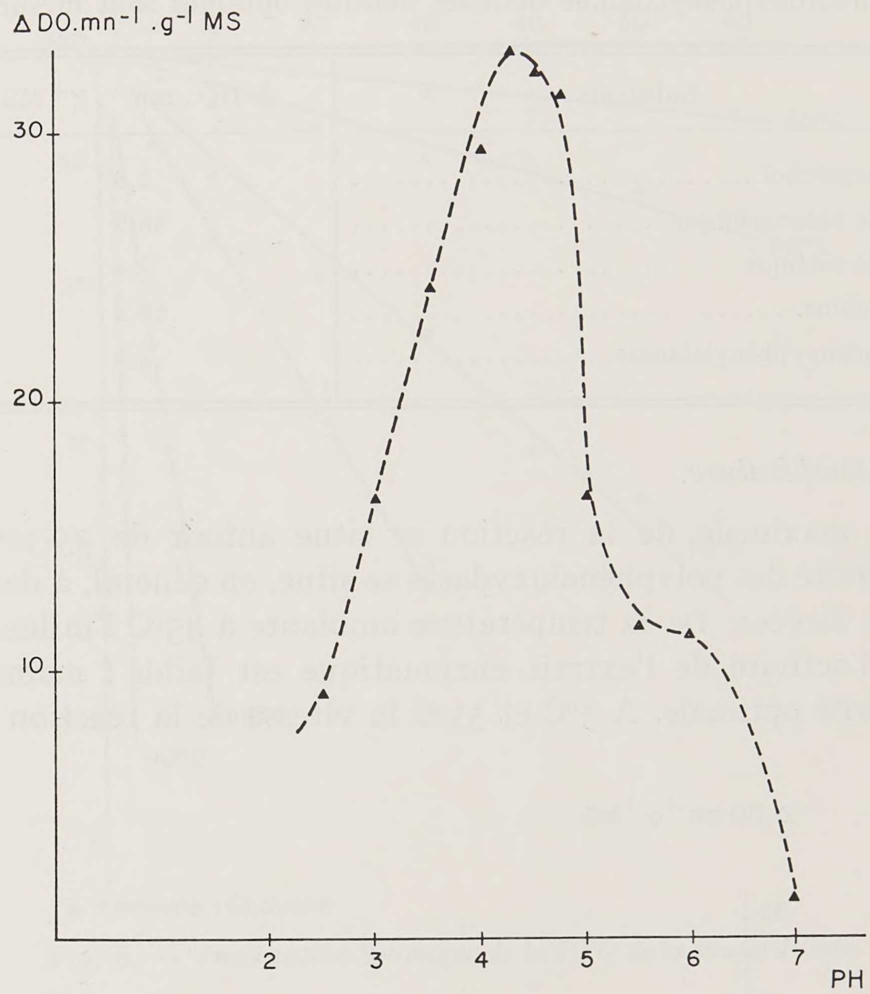


Fig. 4. — *Variation de l'activité enzymatique en fonction du pH*

suggère que plusieurs formes isofonctionnelles de la polyphénoloxydase de la prune coexistent. Deux maxima d'activité en fonction du pH ont été mis en évidence pour la cerise et la pellicule de pomme Red Delicious, notamment. A un certain stade de purification Lanzarini *et al.* (1972) trouvent, pour la cerise, que la vitesse d'oxydation du pyrocatéchol en fonction du pH a deux maxima à pH 4,2 et 6,2; une purification ultérieure entraîne la disparition du maxima à pH 6,2. La PPO de la pellicule de pomme Red Delicious a un pH optimal à 5,1 et un autre à 7,0 tandis que la préparation purifiée a un pH optimal à 4,2 et 7,0 (Stelzig *et al.*, 1972).

Spécificité

Les résultats indiqués dans le tableau 4 montrent, dans les conditions expérimentales retenues, que la PPO de la prune d'Ente a une très grande affinité pour l'acide chlorogénique par rapport aux autres composés phénoliques testés. En général l'acide chlorogénique est un bon substrat des polyphénoloxydases des fruits (Melstad et Brandwein, 1966, Lanzarini *et al.*, 1972, Stelzig *et al.*, 1972) mais la différence avec les autres substrats est remarquable dans le cas de la prune d'Ente. La PPO de la prune ayant beaucoup moins d'affinité pour l'acide caféique il est possible que la diminution des acides chlorogéniques constatée par Puech et Jouret (1974) se produise par oxydation directe sans hydrolyse préalable.

TABLEAU 4

Spécificité de la PPO de la prune d'Ente

(Les densités optiques sont enregistrées à 400 nm sauf pour la dihydroxyphénylalanine dont les densités optiques sont mesurées à 470 nm)

Substrats	Δ DO . mn^{-1} . g^{-1} MS
Pyrocatéchol	2,8
Acide chlorogénique	45,5
Acide caféique	5,6
Catéchine	10,2
Dihydroxyphénylalanine	2,5

Influence de la température.

La vitesse maximale de la réaction se situe autour de 25-30°C (fig. 5). Le maximum d'activité des polyphénoloxydases se situe, en général, à des températures légèrement plus élevées. De la température ambiante à 45°C l'influence du facteur thermique sur l'activité de l'extrait enzymatique est faible : moins de 7 % par rapport à l'activité optimale. A 5°C et 55°C la vitesse de la réaction est réduite de plus de 30 %.

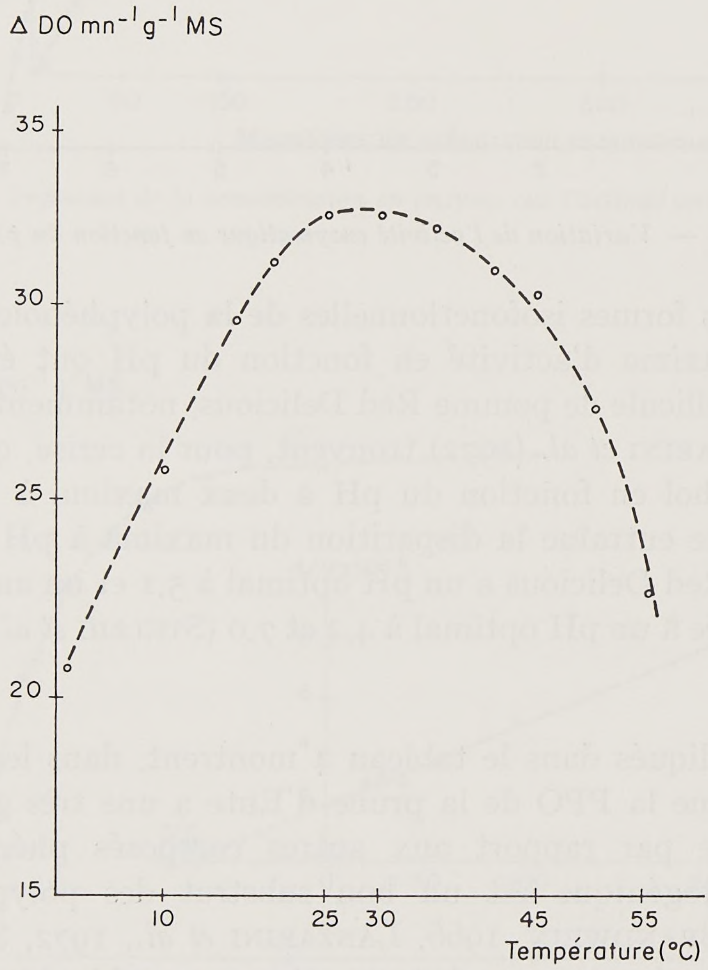


FIG. 5. — *Influence de la température sur la vitesse de la réaction enzymatique*

La figure 6 met en évidence l'influence du temps de chauffage en fonction de la température sur la dénaturation de l'enzyme. Le logarithme de l'activité résiduelle

diminue linéairement avec l'augmentation du temps de chauffage, indiquant que l'inactivation thermique de la PPO de la prune d'Ente suit une cinétique d'ordre I.

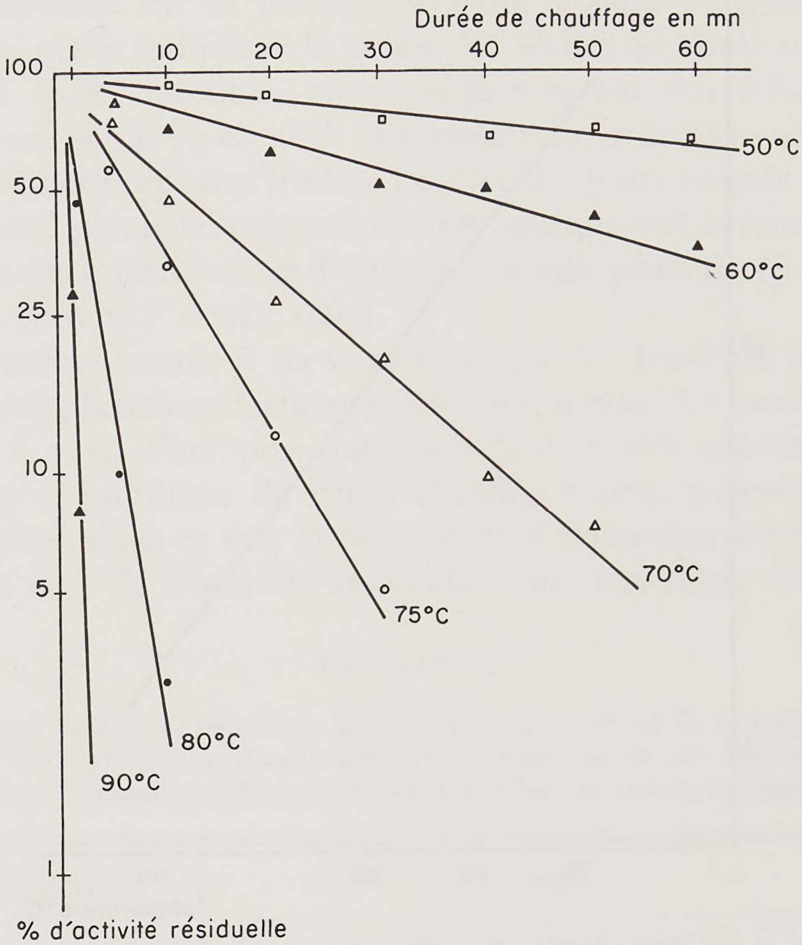


FIG. 6. — *Inactivation thermique de la PPO de la prune d'Ente*

Les valeurs de D (temps de réduction décimal), calculées à partir de ces droites montrent que la PPO de la prune en solution d'extrait brut, est particulièrement résistante à la dénaturation thermique. En effet, la valeur de D est 42,00 à 70°C, 22,0 à 75°C et 1,8 mn à 90°C tandis que CHAN et YANG (1971) ont obtenu une valeur de D à 70°C égale à 1,32 pour la polyphénoloxydase de la myrtille. D'autre part, le coefficient de destruction thermique (z), déterminé en fonction des valeurs de D (GILLESPY 1948, VAROQUAUX *et al.*, 1975) égale à 16°C, est singulièrement élevé (fig. 7). On ne mesure plus d'activité polyphénoloxydasique après un traitement de 5 mn à 85°C. Vis à vis de la dénaturation thermique, la PPO de la prune d'Ente a un comportement similaire à 50°C à pH 3,8 qu'à 70°C à pH 7,5.

C. — *Modification de l'activité au cours de l'élaboration du pruneau*

Cas du séchage discontinu en four ventilé.

Les résultats obtenus sur les échantillons 1972 montrent que la PPO de la prune d'Ente est en majeure partie inactivée pendant la période de « mortification » dans le cas d'un séchage discontinu. L'activité résiduelle des fruits (6 % environ) varie peu, ensuite, jusqu'à la fin du séchage. Ces résultats sont confirmés par les mesures effectuées sur les échantillons 1974 (tabl. 5). Le pruneau en fin de séchage conserve une activité résiduelle de 2 à 3 % par rapport à l'activité de la prune.

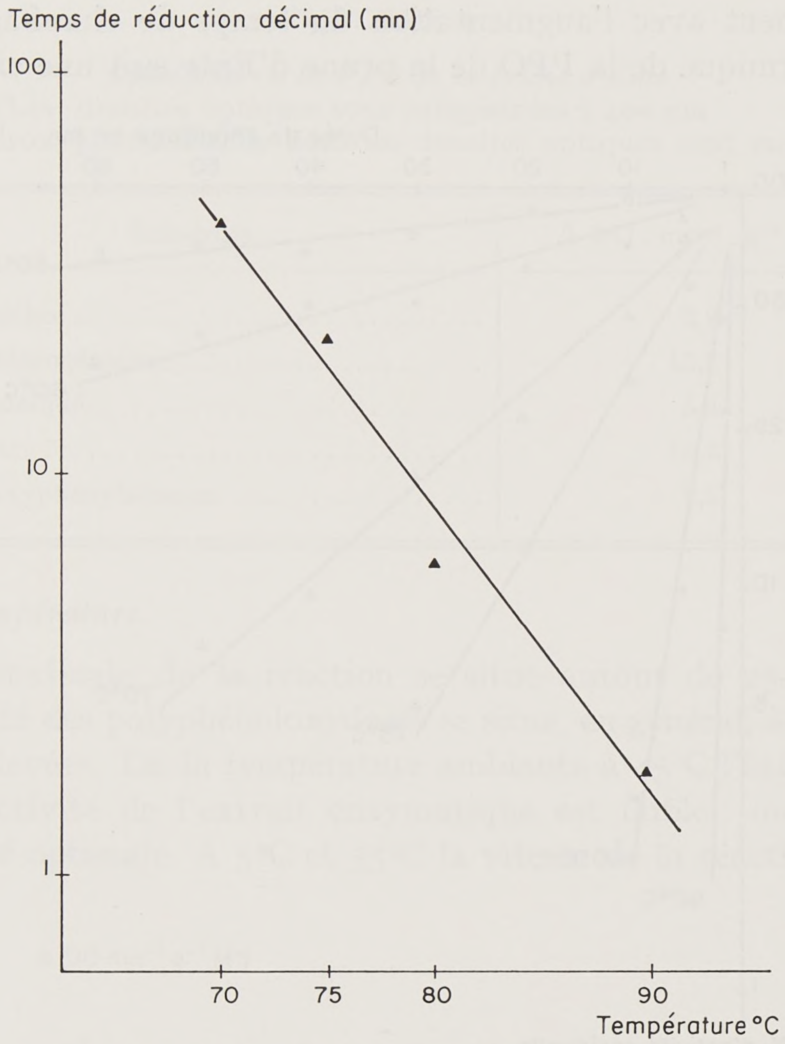


FIG. 7. — *Détermination du coefficient de destruction thermique z*

$$\left(\log D = a - \frac{\theta}{z}\right)$$

TABLEAU 5

Modification de l'activité au cours du séchage en four discontinu
(Résultats exprimés en variation de densité optique par minute et par gramme de matière sèche)

Échantillons	Expérimentation 1972	Expérimentation I 1974	Expérimentation II 1974
Prune	25,9	33,6	37,1
3 heures de chauffage	1,6	—	—
6 heures de chauffage	—	0,6	—
11 heures de chauffage	—	—	1,0
15 heures de chauffage	—	0,8	0,4
Pruneau	0,5	—	0,4
Pruneau à pulpe noircie	0	—	—

Certains composés propres au brunissement se combinent irréversiblement aux protéines ce qui provoque leur inactivation (MASON 1955), ces réactions expliqueraient que les pruneaux dont la pulpe est atteinte d'un brunissement intense ne présentent plus d'activité polyphénoloxydasique décelable.

Cas du séchage en étuve ventilée de laboratoire.

Les résultats précédents ne donnent que des indications sur un mode de séchage, et aucun renseignement sur la période pendant laquelle l'enzyme a une activité élevée; de plus au stade industriel la prune est séchée en continu. L'activité polyphénoloxydasique a été mesurée, en conséquence, sur des échantillons chauffés pendant trois heures à 54, 74 et 90°C. Les températures de 54 et 90°C correspondent à l'environnement thermique des fruits à l'entrée des fours tunnels continus à contre courant et à courant parallèle, respectivement; quelque soit le mode de conduite du séchage, après trois ou quatre heures d'étuvage, en règle générale, les fruits se trouvent placés à 70-74°C (GENTRY *et al.*, 1965).

L'expérimentation menée à 54°C montre que les fruits ne perdent que 20 % de leur activité polyphénoloxydasique après trois heures. Au bout de ce temps, les prunes chauffées à 74°C n'ont plus que 5 à 6 % d'activité résiduelle et les extraits enzymatiques des échantillons de fruits chauffés à 90°C n'oxydent pratiquement plus de pyrocatéchol; dans ce cas, la dénaturation thermique est rapide; les prunes renferment moins de 7 % d'activité résiduelle après une heure d'étuvage (tabl. 6).

TABLEAU 6

Influence du traitement thermique de la prune sur l'activité de la polyphénoloxydase
(Résultats exprimés en variation de densité optique par minute et par gramme de matière sèche. L'activité polyphénoloxydasique de l'échantillon de prune est égale à 32,9)

Température	Durée		
	1 heure	2 heures	3 heures
54 °C.............	31,5	29,4	24,1
74 °C.............	5,0	1,7	1,7
90 °C.............	1,8	1,3	0,3

Les différences entre les cinétiques d'inactivation des extraits enzymatiques (fig. 6) et les résultats obtenus sur les fruits sont dues à la vitesse avec laquelle la température interne de la prune s'élève. Cet accroissement dépend de divers paramètres : température de début de séchage, vitesse de l'air pulsé, extrait sec des fruits notamment.

IV. — DISCUSSION

Activité polyphénoloxydasique et technologie du pruneau.

— Au pH de la prune, la PPO a une activité proche de l'optimum d'activité. Son activité potentielle n'est donc pas entravée par le pH du jus.

— Puisque, de la température ambiante à 45°C, l'activité de la PPO de la prune varie peu, il n'y aura pas de phase d'exaltation du processus enzymatique, due à la température atteinte par le fruit. Par contre, avant que l'enzyme ne soit

dénaturée, c'est vraisemblablement, les modifications de perméabilité cellulaire consécutives à l'élévation de température et à l'élimination de l'eau qui auraient des conséquences directes sur les phénomènes impliquant l'intervention de la polyphénoloxydase par la mise en contact de l'enzyme et de ses substrats.

— Le procédé de séchage traditionnel de la prune prévoyait, dans une première phase, d'introduire les fruits dans le four à feu réduit (40-50°C) en fin de journée, pour la nuit. On conçoit dans ces conditions, à partir du moment où l'enzyme a accès à ses substrats, que l'influence de la polyphénoloxydase puisse se prolonger et engendrer des transformations plus profondes, que dans le cas du séchage en four continu à courant parallèle. En effet, lors de l'utilisation de cette technique de séchage on a signalé des défauts de coloration de la pellicule du pruneau; celui-ci laisse apparaître des plages rougeâtres ou bien la pellicule prend une coloration marron terne. Ces imperfections pourraient être mises en relation avec l'inactivation précoce de la PPO. La période d'oxydation des polyphénols serait donc trop réduite dans ces conditions pour assurer la formation des composés responsables de la pigmentation de la pellicule du pruneau.

Activité polyphénoloxydasique et dégradation des caroténoïdes.

Les pigments caroténoïdes sont dégradés lorsqu'ils sont soumis à des éclairements intenses (ZINSOU et COSTES, 1973) et à des températures élevées (LA ROE et SHIPLEY, 1970). Dans les végétaux leur disparition est souvent liée à l'activité de lipoxygénase. L'oxydation enzymatique couplée des caroténoïdes se produit avec les polyphénols et la polyphénoloxydase du thé (SANDERSON *et al.*, 1971). L'intensité de la disparition de ces pigments dépend de divers facteurs : niveau d'humidité des produits transformés (CHOU et BREENE, 1972), présence d'acide ascorbique et de minéraux (KANNER *et al.*, 1976) notamment. La diminution, la plus remarquable des caroténoïdes de la prune, se situe au début du séchage; période où la température interne du fruit n'est pas encore élevée, et pour laquelle le fruit conserve une activité polyphénoloxydasique. Bien qu'aucune activité lipoxygénasique n'ait pu être mesurée (MOUTOUNET, 1976) sur les préparations enzymatiques de fruits lyophilisés, par les méthodes de BALLS *et al.* (1943) et SURREY (1964), il sera nécessaire d'examiner dans quelles conditions la PPO de la prune d'Ente pourrait intervenir dans la dégradation des caroténoïdes au cours du séchage.

Reçu pour publication en septembre 1976.

SUMMARY

THE PLUM POLYPHENOLOXIDASE
MODIFICATION OF ITS ACTIVITY DURING THE PRUNE MANUFACTURE

The plums (Prunus domestica var. d'Ente) and prunes polyphenoloxidase activity has been measured by a colorimetric method. Some properties of crude enzyme extracted from plum have been determined. The thermal denaturation of the polyphenoloxydase, during the prune manufacture, depend on drying technical used. The technological importance of this results is discussed.

RESUMEN

LA POLIFENOLOXIDASA DE LA CIRUELA DE ENTE MODIFICACION DE SU ACTIVIDAD DURANTE LA ELABORACION DE LA CIRUELA PASA DE AGEN

La actividad polifenoloxidasica del extracto enzimatico de ciruelas y de ciruelas pasas ha sido medida mediante un método colorimétrico. Se han determinado las propiedades generales de los extractos brutos de polifenoloxidasa (PPO) de la ciruela de Ente. La desnaturalizacion térmicade la PPO durante la obtencion de la ciruela pasa depende de la técnica de secado practicada. La importancia tecnologica de los resultados obtenidos es muy controvertida.

RIASSUNTO

LA POLIFENOLOSSIDASI DELLA PRUGNA D'ENTE MODIFICA DELLA SUA ATTIVITA' DURANTE L'ELABORAZIONE DELLA PRUGNA SECCA

L'attività polifenolossidasica d'estratto enzimatico di prugne d'Ente e di prugne secche è stata misurata mediante un metodo colorimetrico. Sono state determinate le proprietà generali di estratti grezzi di polifenolossidasi (PPO) della prugna d'Ente. La denaturazione termica della PPO durante l'ottenimento della prugna secca dipende dalla tecnica di essiccamento praticata. Viene discussa l'importanza tecnologica dei risultati ottenuti.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BALLS A. K., AXELROD B., KIES M. W., 1943. Soybean lipoxidase. *J. Biol. Chem.*, **1949**, 491-504.

BARTHE J. P., 1972. Étude des propriétés de la polyphénoloxydase de *Quercus pendunculata Ehrh.* Thèse doctorat de spécialité Toulouse.

CHAN H. T., YANG H. Y., 1971. Identification and caracterization of some oxidizing enzymes of the Mc Farlin cranberry. *J. of food Sci.*, **35** (1), 169-173.

CHOU H. E., BREENE W. M., 1972. Oxidative decoloration of β carotène in low-moisture systems *J. food Sci.*, **37**, 66-68.

DEMEAUX M., BIDAN P., 1967. Étude de l'inactivation par la chaleur de la polyphénoloxydase du jus de raisin. *Ann. Technol. Agric.*, **16** (2), 75-79.

DIZIK N. S., KNAPP F. W., 1970. Avocado polyphenoloxidase : purification and fractionation on Sephadex thin layers. *J. of food Sci.*, **35**, 282-285.

GENTRY J. P., MILLER W. M., CLAYPOOL L. L., 1965. Engineering and fruit quality aspects of prune dehydration in parallel- and counter-flow tunnels. *Food Techno.*, **19** (9), 121-125.

GILLESPY T. G., 1948. The heat resistance of ther spores of thermophilic bacteria. *Ann. Kept. Fruit and Vegetable Preserv. Research Sta., Campdent, Glos.*, 34-43.

KAHN V., 1975. Polyphenol oxidase activity and browning of three avocado varieties. *J. Sci. Fd Agric.*, **26**, 1319-1324.

KANNER J., MENDEL H., BUDOWSKI P., 1976. Carotene oxidizing factors in red pepper fruits Ascorbic acid. *J. of food Sci.*, **41**, 183-185.

KUBOWITZ F., 1937. Uber die chemische Zuzammensetzung der Kartoffeloxydase. *Biochem., Z.*, **291**, 221-229.

LANZARINI G., PIFFERI P. G., ZAMORANI A., 1972. Specificity of an o-diphenol oxydase from Prunus avium fruits. *Phytochem.*, **11**, 89-94.

LA ROE E. G., SHIPLEY P. A., 1970. Whisky composition : Formation of alfa and beta-ionone by thermal decomposition of beta-carotene. *J. Agr. food Chem.*, **18**, 174-175.

LUH B. S., PHITHAKPOL B., 1972. Caracteristics of polyphenoloxidase related to browning in cling peaches. *J. of food Sci.*, **37**, 264-268.

MASON H. S., 1955. Comparative biochemistry of the phenolase complex. In *Advances in Enzymology*. **16**, F. F., Nord éd., Interscience New York et Londres, 105-184.

MELSTAD J., BRANDWEIN B. J., 1966. The isolation identification and quantitative determination of some organic constituents of *Prunus domestica*. *Proc. S.P. Acad. Sci.*, **45**, 185-195.

MOUTOUNET M., JOURET C., 1975. Les acides aminés de la prune d'Ente et du pruneau d'Agen. *Fruits*, **30** (5), 345-348.

MOUTOUNET M., DUBOIS P., JOURET C., 1975. Les composés volatils majeurs du pruneau d'Agen. *C. R. Acad. Agri. Fr.*, 581-585.

MOUTOUNET M., 1975. Les caroténoïdes de la prune d'Ente et du pruneau d'Agen. *Ann. Techn. Agric.*, **24** (4), sous presse.

MOUTOUNET M., 1976. (données non publiées).

PALMER J. K., 1963. Banana polyphenoloxidases. Preparation and properties. *Plant Physiol.*, **38**, 508-513.

PONTING J., JOSLYN M. A., 1948. Ascorbic acid oxidation and browning in apple tissue extracts. *Arch. Biochem.*, **19**, 47-63.

PUECH J. L., JOURET C., 1974. Les acides à noyau aromatique de la prune d'Ente et du pruneau d'Agen. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, 16 janv., 92-96.

SANDERSON G. W., CO H., GONZALEZ J. G., 1971. Biochemistry of tea fermentation the role of carotenes in black tea aroma formation. *J. of food Sci.*, **36** (2), 231-236.

SANDERSON G. M., GRAHAM H. N., 1973. On the formation of black tea aroma. *J. Agr. food Chem.*, **21** (4), 576-585.

STELZIG D. A., AKHTAR S., RIBIERO S., 1972. Catechol oxidase of red delicious apple peel. *Phytochem.*, **11**, 535-539.

SURREY K., 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxydase activity. *Plant Physiol.*, **39**, 65-70.

VAROQUAUX P., CLOCHARD A., SARRIS J., AVISSE Cl., MORFAUX J. N., 1975. Détermination automatique de l'inactivation thermique et de la régénération des enzymes. Application à la peroxydase du pois (*Pisum sativum* L.) *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **8**, 60-63.

ZINSOU C., COSTES C., 1973. Photodécoloration du β carotène en solution. *Physiol. Vég.*, **11**, 191-206.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (4), 357-372.

ÉVOLUTION, EN COURS DE CONSERVATION, DES CARACTÉRISTIQUES DE TENDRETÉ DE MUSCLES DE BOVINS MIS SOUS VIDE *ANTE RIGOR MORTIS*

C. VALIN, J. FOURNAUD,* A. LACOURT et C. TOURAILLE

avec la collaboration technique de J. L. FOURNIER, R. LABAS, M. C. BAYLE et R. LAURET

Station de Recherches sur la Viande
Centre de Recherches de Clermont-Ferrand
I. N. R. A. - Theix
63110 Beaumont

* *Station de Recherches sur la Viande,*
Laboratoire C. N. R. Z.
78350 Jouy-en-Josas

RÉSUMÉ

Cette recherche visait à tester les possibilités d'utilisation pratique du désossage à chaud des carcasses de bovin, associé à l'emballage sous vide de la viande.

Il s'avère que la technique qui combine le désossage deux heures *post mortem*, l'emballage sous vide de la viande, la réfrigération dans une ambiance à + 10°C au cours de l'installation de la *rigor mortis* suivie d'un stockage à 0, + 2°C permet sur le plan microbiologique de conserver la viande pendant 21 jours dans de bonnes conditions d'hygiène. En particulier cette technique entraîne un développement important de la flore lactique, un ralentissement marqué de la croissance des *Pseudomonas* et un bon contrôle de la croissance de *Microbacterium*.

En ce qui concerne la qualité de la viande, la mise en œuvre de cette technologie n'entraîne pas d'augmentation des pertes de poids ni en cours de conservation, ni à la cuisson. Elle évite de plus les pertes de poids du ressuyage.

La longueur des sarcomères des muscles désossés à chaud est significativement plus courte que celle des sarcomères des muscles réfrigérés sur la carcasse. Cette différence de degré de contraction se traduit par des différences significatives de tendreté après huit jours de conservation, différences qui tendent à s'annuler avec l'allongement du temps de maturation de la viande.

INTRODUCTION

La mise en œuvre des opérations de désossage et de conditionnement des viandes dans les instants qui suivent l'abattage présente certains avantages potentiels, tant

sur le plan économique, par une réduction des immobilisations et des coûts de réfrigération, que sur le plan technologique, par une meilleure utilisation des déchets gras, os, et la possibilité de formage à chaud de certains muscles, ce qui peut en améliorer l'utilisation bouchère.

En contre-partie, de nouveaux problèmes surgissent. Le travail des carcasses chaudes comporte un risque notable de pollution, ce qui peut limiter la durée de conservation des produits, donc l'utilisation pratique du procédé (BILLAULT *et al*, 1973).

Quant aux qualités organoleptiques de la viande et, en particulier, la tendreté, elles peuvent être altérées. Le désossage à chaud s'accompagne inévitablement d'une certaine contraction de la musculature, contraction qui peut s'amplifier lors de la réfrigération de la viande. Or il est bien établi que l'installation de la *rigor mortis*, dans les muscles contractés, peut provoquer un durcissement important de la viande (LOCKER, 1960; HERRING *et al.*, 1965; MARSH et LEET, 1966).

D'ores et déjà, plusieurs auteurs ont montré que, dans certaines conditions, le désossage à chaud pouvait conduire à l'obtention de viandes dont les qualités organoleptiques ne paraissent pas significativement différentes de celles obtenues après un traitement conventionnel des carcasses. Mais dans la plupart des travaux publiés les effets du désossage à chaud ont été testés par comparaison avec des viandes non maturées (SCHMIDT et GILBERT, 1970; KASTNER *et al.*, 1973; FALK *et al.*, 1975; KASTNER et RUSSEL, 1975). Or dans ces conditions, il n'est pas évident qu'une différence significative de dureté entre muscle contracté et muscle non contracté soit perceptible; cette différence s'affirme, pour les dégustateurs, en cours de maturation (VALIN, 1973). Enfin, excepté SCHMIDT et GILBERT (1970), ces auteurs n'ont pas abordé l'examen des problèmes microbiologiques posés par cette nouvelle technologie des carcasses, ce qui rend difficile d'augurer du devenir des viandes ainsi traitées lors d'une conservation de plus ou moins longue durée à l'état réfrigéré.

Le but de notre travail était de tester la possibilité d'utilisation pratique du désossage à chaud des carcasses associé à l'emballage sous vide de la viande, d'une part en évaluant les risques microbiens associés à cette technique et, d'autre part en contrôlant l'évolution des qualités organoleptiques de la viande en cours de conservation à l'état réfrigéré.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'expérience a porté sur un lot de 8 vaches normandes de poids moyen de carcasse de 340 kg (± 16 kg). L'abattage, la découpe et l'emballage sous vide ont été réalisés dans un abattoir industriel.

Sur chaque animal, les trois muscles *Tensor fasciae latae* (TFL), *Semitendinosus* (ST) et *Rectus abdominis* (RA) d'une demi-carcasse ont été prélevés deux heures après l'abattage, mis sous vide dans des sacs rétractables Cryovac BB, puis placés à la température de + 11°C pendant 36 heures et enfin stockés à 0, + 2°C pendant 21 jours; l'ensemble de ces opérations constituera le traitement expérimental. Les demi-carcasses témoins ont été tout d'abord refrigérées dans une salle à (+ 3, + 6°C) pendant 36 heures, puis les trois muscles, TFL, ST, RA ont été prélevés, mis sous vide et conservés à 0, + 2°C (traitement témoin).

Un contrôle bactériologique initial a été réalisé lors de chaque mise sous vide puis l'évolution des caractéristiques physiques, organoleptiques et microbiologiques des viandes a été contrôlée après 8 et 21 jours de conservation à (0, + 2°C) (4 animaux à chaque stade.)

Les analyses bactériologiques ont été effectuées selon les méthodes décrites précédemment par FOURNAUD *et al.*, (1973). L'interprétation statistique des résultats fait appel au test *t* de différence des moyennes. Avant tout calcul, les données numériques sont transformées en données logarithmiques. Dans le cas où on ne peut déterminer le nombre d'une population bactérienne donnée, on attribue la valeur immédiatement inférieure au seuil de dénombrement.

Le degré de contraction des sarcomères a été mesuré sur coupes de 6 nm d'épaisseur réalisées à l'aide d'un cryotome IEC à la température de — 20°C. Les coupes collées sur lamelles sont montées dans une goutte de solution de Ringer. L'observation a été faite par microscopie en contraste de phase et la longueur des sarcomères déterminée par mesure de l'image sur écran de télévision après étalonnage à l'aide d'un micromètre objectif. La longueur moyenne des sarcomères est calculée à partir de 30 mesures de segments de 20 sarcomères.

La tendreté de la viande a été évaluée par un jury de dégustation (18 dégustateurs en moyenne) opérant selon un test de comparaison par paire. Chaque dégustateur fait cuire ses échantillons (environ 7 g) dans de l'huile à 150°C pendant un temps laissé à son appréciation (TOURAILLE, 1976). La tendreté a été également mesurée avec l'appareil de SALE (1971) par cisaillement de la viande crue et de la viande après chauffage de 30 minutes dans de l'huile à 73°C.

RÉSULTATS

1. — *Etude microbiologique*

Le mode de désossage influe sur l'évolution des différentes populations microbiennes de surface des muscles (fig. 1) en cours de conservation.

Dans le cas du désossage à chaud, la flore totale augmente tout au long des 21 jours de conservation. Par contre, pour les viandes mises sous vide après réfrigération en carcasse, on observe une phase de latence jusqu'au huitième jour. Après 21 jours de conservation, le nombre total de bactéries est multiplié par 32 dans le cas du désossage à chaud et par 5,5 dans le cas des témoins.

Dans le cas des bactéries putréfiantes, il apparaît un effet significatif du mode de traitement sur le développement des *Pseudomonas* (tabl. 1) dont le nombre reste pratiquement constant dans le traitement expérimental et augmente de 7,5 fois chez les témoins.

TABLEAU I

Étude de l'influence du mode de désossage sur l'évolution de diverses populations microbiennes. Comparaison par couples (expérimental-témoin)

Δ Différence (en log) entre le facteur de multiplication obtenu pour les muscles désossés à chaud et celui observé pour les muscles désossés 48 h *post mortem*.

	8 jours *post mortem*		21 jours *post mortem*	
	Δ	Seuil de signification	Δ	Seuil de signification
Flore totale	0,92	0,01	0,77	0,02
Acinetobacter	— 0,09	NS	— 0,95	0,10 (NS)
Pseudomonas	— 0,08	NS	— 0,77	0,02
Entérobactéries	— 0,30	NS	0,62	NS
Micrococcus	— 0,22	NS	— 0,87	NS
Lactobacillus	3,34	0,001	1,83	0,001
Microbacterium	0,14	NS	— 0,36	NS

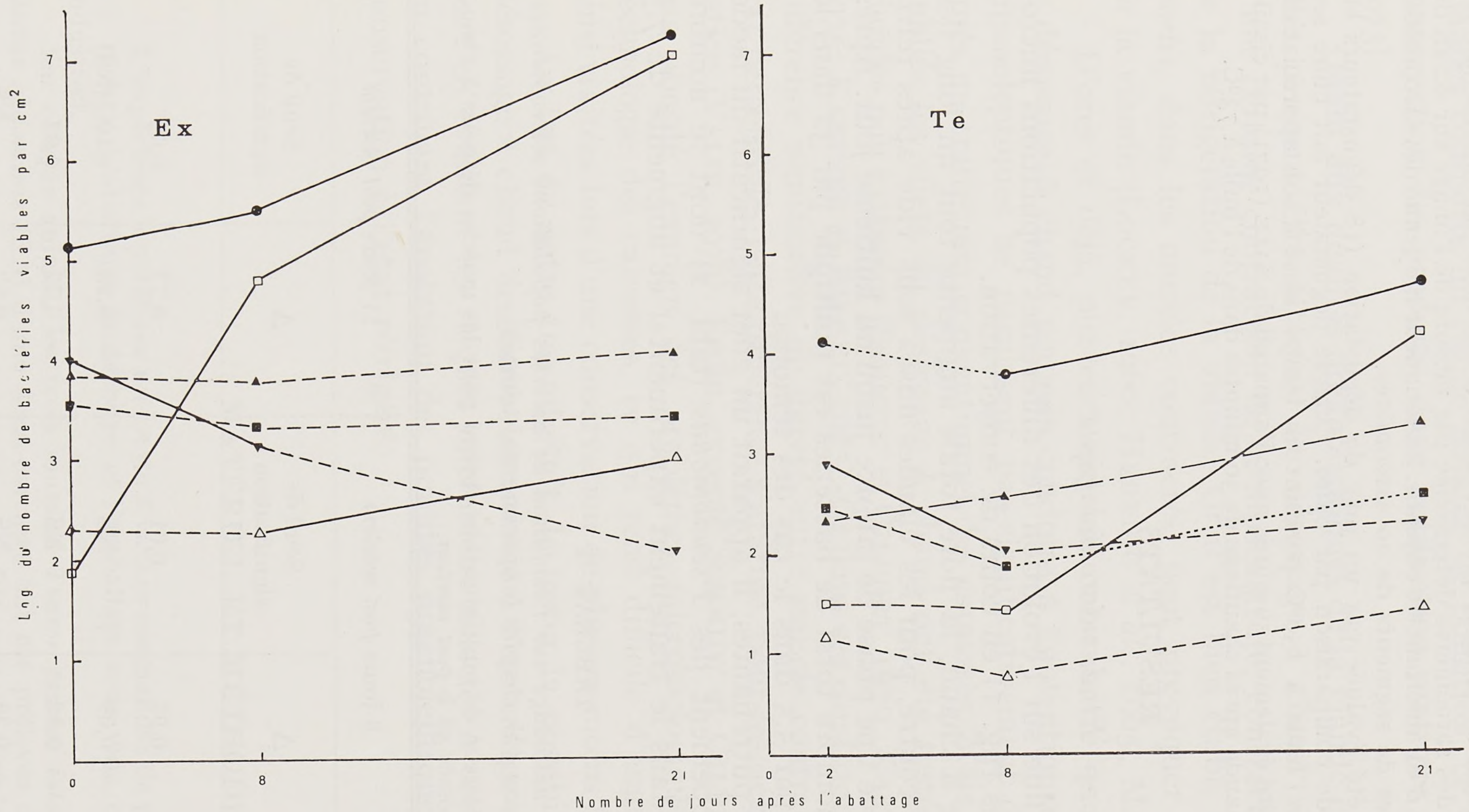


FIG. 1. — *Évolution moyenne des différentes populations microbiennes en surface de viande au cours de la conservation sous vide à 0 + 2°C*

Ex. : Expérimental Te : Témoin

Flore totale ●
Lactobacillus □
Microbacterium ■
Pseudomonas ▲
Acinetobacter ▼
Enterobacteries △
Évolution significative ————
Évolution significative entre 2 et 21 jours après abattage — - — - —
Tendance à une évolution significative - - - - - - - -
Évolution non significative — — — —

Acinetobacter ainsi que les entérobactéries n'évoluent pas d'une façon significativement différente entre les expérimentaux et les témoins. Les entérobactéries croissent significativement sur les muscles désossés à chaud au-delà du huitième jour de conservation mais la variabilité entre muscles est importante et masque l'effet du traitement.

Pour *Microbacterium*, bactérie du verdissement, on n'enregistre pas de différence significative en fonction du mode de désossage et de conditionnement.

Les *Lactobacillus* présentent une évolution influencée d'une façon hautement significative par le traitement technologique; le facteur de multiplication sur les témoins entre le deuxième et le vingt-et-unième jour de conservation (540) est très inférieur à celui observé sur les muscles expérimentaux au cours des 8 premiers jours de conservation (1 500).

Les bactéries, test d'hygiène, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus D* ne se développent pas, quel que soit le traitement.

Il faut noter que, lors de la mise sous vide, les muscles conditionnés à chaud présentent une moyenne de contamination légèrement supérieure à celle des viandes témoins. Si le désossage à chaud n'est pas suivi immédiatement de l'emballage sous vide, les écarts observés peuvent être importants (tabl. 2). En particulier, *Pseudomonas*, les entérobactéries et *Microbacterium* sont décelés sur tous les muscles désossés à chaud et parfois même en nombre élevé ($2 \cdot 10^6/cm^2$ pour *Pseudomonas* et entérobactéries).

2. — *Caractéristiques physiques et organoleptiques*

2. 1. *Degré de contraction.*

Le désossage à chaud s'accompagne d'une contraction notable bien que l'installation de la *rigor mortis* se fasse à la température de + 11°C. Les différences de longueur de sarcomère entre muscles expérimentaux et témoins sont hautement significatives après 8 et 21 jours de conservation (tabl. 3). Globalement, au niveau du muscle, on enregistre des raccourcissements moyens de 20,9 et 3 p. 100 pour RA, TFL et ST respectivement. On observe également que la différence entre témoins et expérimentaux s'atténue avec le temps de conservation. Entre 8 et 21 jours de conservation, la différence d'état de contraction, appréciée par les longueurs de sarcomères, diminue de 43,5 p. 100 et 59,3 p. 100 pour les muscles TFL et ST. Ceci est dû à un allongement significatif des sarcomères des muscles désossés à chaud. Pour le muscle RA, on enregistre le même état de contraction à 21 jours qu'à 8 jours, les longueurs des sarcomères des RA témoins et expérimentaux évoluant dans le même sens. Le tableau 4 permet de situer les longueurs des sarcomères des muscles témoins et expérimentaux par rapport à la longueur théorique au repos du sarcomère qui s'évalue à 2,1 nm (MARSH et CARSE, 1974).

Compte tenu des résultats de MARSH et LEET (1966), l'évolution de la structure myofibrillaire observée en cours de conservation devrait contribuer à annuler les différences de tendreté entre muscles expérimentaux et muscles témoins qui pourrait être observées après huit jours de conservation.

2. 2. *Pertes de poids.*

L'examen des pourcentages de perte de poids lors de la conservation sous vide à 0, + 2°C ne fait pas apparaître de différence significative entre les témoins et les

TABLEAU 2

Nombre de bactéries par cm² en surface des carcasses et des muscles avant conditionnement sous vide

A : Carcasses après abattage

B : Muscles désossés à chaud

C : Muscles désossés 48 h *post mortem*

	A		B		C	
	Moyenne	Valeurs extrêmes	Moyenne	Valeurs extrêmes	Moyennes	Valeurs extrêmes
Flore totale	$1,7 \times 10^2$	$8 \times 10^0 - 5,7 \times 10^3$	$7,1 \times 10^5$	$8,8 \times 10^4 - 4,8 \times 10^6$	$1,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3 - 8,5 \times 10^4$
Acinetobacter	$\leqslant 5 \times 10^0$	$\leqslant 3 \times 10^0 - 1,4 \times 10^1$	$3,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^3 - 3,7 \times 10^5$	$2,7 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2 - 2,1 \times 10^4$
Pseudomonas	$\leqslant 4 \times 10^0$	$\leqslant 3 \times 10^0 - 4 \times 10^0$	$3,3 \times 10^5$	$2,6 \times 10^4 - 2,6 \times 10^6$	$\leqslant 2,7 \times 10^2$	$\leqslant 3 \times 10^0 - 4,4 \times 10^4$
Enterobactéries	$\leqslant 3 \times 10^0$	$\leqslant 3 \times 10^0$	$2,7 \times 10^3$	$4,4 \times 10^1 - 0,8 \times 10^4$	$\leqslant 1,8 \times 10^1$	$\leqslant 3 \times 10^0 - 2,4 \times 10^2$
Micrococcus	$1,1 \times 10^2$	$4 \times 10^0 - 5,1 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$3,5 \times 10^2 - 6,1 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$	$1,6 \times 10^2 - 1,6 \times 10^4$
Lactobacillus	$\leqslant 4 \times 10^0$	$\leqslant 3 \times 10^0 - 1,2 \times 10^1$	$1,2 \times 10^2$	$8 \times 10^0 - 1,6 \times 10^3$	$4,1 < 10^1$	$4 \times 10^0 - 1,3 \times 10^3$
Microbacterium	$\leqslant 5 \times 10^0$	$\leqslant 3 \times 10^0 - 2,0 \times 10^1$	$5,8 \times 10^4$	$5,7 \times 10^3 - 4,7 \times 10^5$	$2,6 \times 10^2$	$\leqslant 3 \times 10^0 - 1,3 \times 10^4$

TABLEAU 3

Influence du mode de désossage sur la longueur des sarcomères
T = Témoin E = Expérimental

Temps de conservation	Muscles		Longueur moyenne en nm	$\frac{T - E}{T} \times 100$	Seuil de signification de la différence des moyennes
8 jours	RA	T	2,62 ± 0,44	32,1	P < 0,001
		E	1,78 ± 0,34		
	ST	T	2,13 + 0,34	26,3	P < 0,001
		E	1,57 ± 0,27		
	TFL	T	2,57 ± 0,57	27,2	P < 0,001
		E	1,87 ± 0,55		
21 jours	RA	T	2,91 ± 0,23	34,4	P < 0,001
		E	1,91 ± 0,28		
	ST	T	2,00 ± 0,31	10,7	P < 0,001
		E	1,84 ± 0,18		
	TFL	T	2,41 ± 0,58	15,4	P < 0,001
		E	2,04 ± 0,25		

TABLEAU 4

État de contraction et d'élongation de l'appareil contractil des muscles en fonction du temps de conservation

	Expérimental			Témoin
	Degré de contraction mesuré (en p. 100)		Degré de contraction par rapport à la longueur au repos (2,1 nm) (en p. 100)	Élongation par rapport à la longueur au repos
8 jours	RA	32,1	15	125
	ST	26,3	26,3	100
	TFL	27,2	11	122
21 jours	RA	34,3	10	139
	ST	10,7	10,7	98
	TFL	15,4	3	115

muscles prélevés à chaud (moyenne des différences de perte de poids par couple $\overline{D} = 0,03 \pm 0,5$). Cette appréciation des pertes de poids est partielle en ce qui concerne les témoins dont les carcasses subissent une certaine dessication, non mesurée, au cours du stockage de 36 heures à + 5, + 6°C.

Lors de la cuisson, on ne met pas non plus en évidence de différences significatives de pertes de poids entre les muscles témoins et expérimentaux ($\overline{D} = -1,45 \pm 0,86$).

TABLEAU 5

Influence du mode de désossage et du temps de conservation sur les différences de caractérisques de cisaillement entre les muscles témoins et expérimentaux. Test de comparaison par couple témoin-expérimental

$\overline{D}$ et $^{s}\overline{D}$: Moyenne et écart-types des différences par couple témoin-expérimental
F : En décanewton et W en décijoule

		Muscle cru	Muscle cuit
Tous les muscles après 8 et 21 jours de conservation	^{F}DN	$\overline{D} = 0,98$ $^{s}\overline{D} = 0,27$ $P < 0,01$	$\overline{D} = -0,01$ $^{s}\overline{D} = 0,27$ NS
	^{W}dJ	$\overline{D} = 0,32$ $^{s}\overline{D} = 0,15$ $P < 0,01$	$\overline{D} = -0,35$ $^{s}\overline{D} = 0,23$ NS
Tous les muscles après 8 jours de conservation	^{F}DN	$\overline{D} = 1,06$ $^{s}\overline{D} = 0,27$ $P < 0,01$	$\overline{D} = -0,40$ $^{s}\overline{D} = 0,36$ NS
	^{W}dJ	$\overline{D} = 0,36$ $^{s}\overline{D} = 0,24$ NS	$\overline{D} = -0,53$ $^{s}\overline{D} = 0,39$ NS
Tous les muscles après 21 jours de conservation	^{F}DN	$\overline{D} = 0,77$ $^{s}\overline{D} = 0,47$ NS	$\overline{D} = 0,37$ $^{s}\overline{D} = 0,37$ NS
	^{W}dJ	$\overline{D} = 0,31$ $^{s}\overline{D} = 0,17$ NS	$\overline{D} = -0,24$ $^{s}\overline{D} = 0,28$ NS

2. 3. *Mesure physique de la tendreté.*

Les tableaux 5 et 6 rapportent les résultats de l'analyse statistique des différences des caractéristiques de cisaillement des muscles témoins et des muscles désossés à chaud (test *t* de comparaison par couple).

TABLEAU 6

Analyse par muscle de l'influence du mode de désossage et du temps de conservation sur les différences de force de cisaillement Test par couple témoin-expérimental

$\overline{D}$: Moyenne des différences par couple témoin-expérimental
La force de cisaillement est exprimée en décanewton

Temps de conservation	Muscles	Cru	Cuit
8 jours	RA	$\overline{D}$ = 1,01 ± 0,2 P < 0,02	$\overline{D}$ = — 0,41 ± 0,94 NS
	TFL	$\overline{D}$ = 1,41 ± 0,34 P < 0,05	$\overline{D}$ = — 0,20 ± 0,6 NS
	ST	$\overline{D}$ = 0,75 ± 0,7 NS	$\overline{D}$ = — 0,60 ± 0,30 NS
21 jours	RA	$\overline{D}$ = 1,61 ± 0,65 NS	$\overline{D}$ = 0,60 ± 0,35 NS
	TFL	$\overline{D}$ = 1,77 ± 0,8 NS	$\overline{D}$ = 0,78 ± 0,53 NS
	ST	$\overline{D}$ = 0,26 ± 0,26 NS	$\overline{D}$ = 0,29 ± 0,9 NS

Dans le tableau 5, l'analyse porte sur tous les muscles regroupés. Il apparaît que le désossage à chaud a un effet significatif sur les caractéristiques de cisaillement du muscle cru. La diminution de la force maximum de cisaillement qui est enregistrée sur les muscles expérimentaux par rapport à leurs témoins est caractéristique d'un état de contraction plus prononcée des premiers (RHODES, DRANSFIELD, 1974; VALIN, LACOURT, 1974). On constate par ailleurs que l'allongement du temps de conservation tend à annuler cette différence qui est particulièrement accusée après 8 jours de conservation. Par contre, il n'apparaît pas, dans nos conditions expérimentales, de différences significatives au niveau des caractéristiques de cisaillement des muscles cuits.

L'analyse par muscle (tabl. 6) de l'effet du traitement expérimental sur la valeur de la force maximale de cisaillement concorde avec les résultats de l'analyse du degré de contraction, apprécié par la mesure de la longueur des sarcomères, et de son évolution en cours de conservation. La diminution de F est d'autant plus marquée que le muscle désossé à chaud a une longueur de sarcomère plus courte par rapport à celle du témoin. Mais on constate également que l'évolution subie par le témoin en cours de conservation n'est pas sans influencer (cf. muscle RA) la différence des forces de cisaillement entre muscle témoin et expérimental.

TABLEAU 7

Influence du mode de désossage et du temps de conservation sur la tendreté de la viande estimée par un jury de dégustateurs. Les résultats sont exprimés en nombre de dégustateurs

Seuil de signification des différences : * P < 0,05
** P < 0,01
*** P < 0,001

	RA			TFL			ST		
	Témoin plus tendre	Pas de différence	Expéri-mental plus tendre	Témoin plus tendre	Pas de différence	Expéri-mental plus tendre	Témoin plus tendre	Pas de différence	Expéri-mental plus tendre
Résultats globaux	87 ***	23	35	71	16	58	74 *	21	50
Après 8 jours de conservation .	45 **	12	18	44 **	6	25	44 **	11	20
Après 21 jours de conservation.	42 **	11	17	27	10	33	30	10	30

2. 4. *Analyse sensorielle*

Les dégustateurs devaient vérifier l'existence d'une différence entre les échantillons (comparaison par paire), identifier le plus tendre et noter l'intensité de la différence. La signification des différences a été jugée par un test

$$X^2 = \frac{(n_1 - n_2 - 1)^2}{n_1 + n_2}$$

en faisant abstraction des dégustateurs n'ayant pas trouvé de différence (n_1 et n_2 : nombre de dégustateurs trouvant respectivement le témoin ou l'expérimental plus tendre).

Les résultats de l'analyse sensorielle (tabl. 7) mettent bien en évidence l'influence du degré de contraction du muscle sur le déterminisme de la tendreté de la viande. Une différence hautement significative apparaît pour le muscle RA dont le degré de contraction dépassait 30 p. 100 alors que pour TFL et ST on a observé un degré de contraction qui est à la limite de celui qui correspond, selon MARSH et LEET (1966) à une altération de la tendreté de la viande après cuisson.

L'analyse sensorielle met en évidence également l'évolution qui s'opère en cours de conservation. Seul le muscle RA, dont la différence de degré de contraction entre témoins et expérimentaux n'évolue pas, conduit à l'observation d'une différence significative à 21 jours. Les muscles ST et TFL pour lesquels les degrés de contraction diminuent de moitié entre 8 et 21 jours ne présentent plus à cette date de différence significative de tendreté entre les témoins et les expérimentaux.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Du point de vue bactériologique, la technique expérimentale testée permet une conservation de la viande pendant 3 semaines à la température de 0, + 2°C dans de bonnes conditions d'hygiène. Compte tenu de la nature de la flore qui croît en cours de stockage, on pourrait même avancer que la technique mise à l'essai s'avère supérieure à la méthode conventionnelle de l'emballage sous vide de la viande après ressuyage en carcasse. En particulier la croissance de *Pseudomonas* est inhibée sur les muscles qui subissent le traitement expérimental. D'une façon générale, la croissance de cette bactérie sur la viande emballée sous vide est d'autant plus limitée que le taux d'oxygène résiduel dans l'emballage est plus bas (FOURNAUD *et al.*, 1973). Lors du désossage à chaud suivi d'une mise sous vide immédiate, il est vraisemblable que l'oxygène résiduel est rapidement consommé par la respiration du tissu musculaire qui reste élevée dans les conditions de pH et de température qui sont celles du muscle à ces instants (BENDALL, 1972). Par contre, ce milieu est très favorable au développement de *Lactobacillus*, d'autant que la température ne décroît pas en dessous de + 10°C au cours des 36 premières heures (HEINZ, 1975). Ce régime de température devrait également privilégier le développement de deux autres populations bactériennes, *Microbacterium* et les entérobactéries. Mais *Microbacterium* croît moins rapidement en absence d'oxygène (ROTH et CLARK, 1972) et semble inhibé par *Lactobacillus* (ROTH et CLARK, 1972; FOURNAUD *et al.*, 1973). Pour les entérobactéries, si on observe un certain développement (fig. 1) il demeure moins important que celui rapporté par HEINZ (1975); la différence est vraisemblablement

imputable à une température de stockage plus basse dans notre expérience que celle utilisée par cet auteur. Il apparaît, dans notre cas, que le maintien à + 11°C raccourcit seulement la durée de la phase de latence sans que cela entraîne une différence significative par rapport aux témoins après 21 jours de conservation.

L'association de l'emballage sous vide à la technique du désossage à chaud élimine le facteur limitant que pourrait constituer le microbisme, ceci par le biais d'une sélection de la flore qui croît en cours de stockage. Il faut souligner que nos résultats ont été obtenus en abattoir industriel, sans précaution particulière, ce qui laisse supposer un progrès possible au niveau de l'opération de désossage se traduisant par une diminution sensible de la flore totale initiale dont le compte pourrait alors se rapprocher des résultats obtenus par SCHMITT et GILBERT (1970).

En ce qui concerne les caractéristiques physiques des muscles, il est intéressant de noter que le désossage à chaud et le maintien des muscles, mis sous vide, à une température voisine de + 10°C au cours de l'installation de la *rigor mortis*, ne s'accompagne pas de pertes de poids excessives comme on pouvait le craindre, compte tenu de l'effet, bien connu, des températures élevées sur l'ampleur des pertes de poids en carcasse. Le conditionnement sous vide n'est sans doute pas étranger à ce résultat qui, par ailleurs, corrobore tant ceux de KASTNER *et al.* (1974) établis pour une durée de conservation très brève de 48 heures que ceux de SCHMIDT et KEMAN (1974) obtenus après 9 jours de conservation. Quant au comportement à la cuisson, l'absence de différence significative de perte de poids entre muscles témoins et expérimentaux confirme les résultats de LOCKER et DAINES (1974).

L'étude, par le biais de l'analyse sensorielle, de l'influence du traitement expérimental sur la tendreté de la viande montre, d'une part, que l'effet du traitement est perceptible par le consommateur lorsque la période de conservation est relativement courte et, d'autre part, que cet effet s'atténue, voire disparaît, pour certains muscles avec l'allongement de la période de stockage. De toute façon, même quand sont apparues des différences significatives entre muscles témoins et expérimentaux, ces derniers n'étaient pas altérés au point de n'être plus acceptables après cuisson. Ces résultats montrent la sensibilité dont peut faire preuve un jury, et son aptitude à déceler des différences de tendreté, relativement fines, qui ne sont pas mises en évidence de façon significative, par des mesures de cisaillement sur muscle cuit, du moins dans nos conditions expérimentales. Il faut signaler à ce propos que le comportement plastique de la viande après cuisson enlève beaucoup de valeur aux tests de cisaillement sur viande cuite pour juger de leur tendreté. Ceci ne retire rien, par ailleurs, de l'intérêt des méthodes de cisaillement sur viande crue ou cuite, pour apprécier des modifications de la structure du muscle.

La confrontation de nos résultats avec ceux obtenus par RHODES et DRANSFIELD (1974) sur muscle cru et par MARSH et CARSE (1974) sur viande cuite permet de situer les limites de l'influence de la contraction sur le déterminisme de la dureté de la viande.

D'une façon générale la tendreté ou son inverse, la dureté, sont fonction, d'une part de la teneur des muscles en collagène ainsi que de l'état physique du collagène et, d'autre part, de l'état de contraction des myofibrilles et du degré de maturation des protéines myofibrillaires. Il est bien établi qu'à un âge donné, la dureté croît avec la teneur en collagène (cœfficient de corrélation de l'ordre de + 0,8; BOCCARD

et al., 1967). Par ailleurs, pour une teneur en collagène donnée, le passage du muscle en *rigor mortis* dans un état contracté augmente la dureté de la viande après cuisson (LOCKER, 1960). Par contre, sur le muscle cru la contraction de la myofibrille entraîne une diminution de la force de cisaillement. En fait, le collagène et la myofibrille ne sont pas deux facteurs indépendants vis-à-vis de la définition de la dureté ou du comportement du muscle au cisaillement. RHODES et DRANSFIELD (1974) montrent que l'augmentation de la force de cisaillement du muscle cru, en fonction de l'élongation, ou sa diminution en fonction de la contraction, sont d'autant plus importantes que la teneur du muscle en collagène est élevée. A la limite, sur le muscle *Psoas major* très pauvre en collagène, ils n'observent aucune influence de la longueur relative du muscle cru sur la force de cisaillement. En fait, avec l'appareil de SALE on observe que le *Psoas* suit la loi générale (VALIN, 1973), la force de cisaillement diminuant lors de la contraction de ce muscle. Dans la présente expérience, on constate pour les muscles RA et TFL un comportement analogue à celui rapporté par RHODES et DRANSFIELD (1974) alors que pour le muscle ST, malgré un degré de contraction de 25 p. 100, on n'enregistre pas de différence significative pour la valeur de F entre le témoin et l'expérimental. Dans une expérience antérieure, nous avions obtenu un résultat identique pour le muscle ST affecté d'un degré de contraction identique (LACOURT, rapporté par VALIN, 1973). Cette particularité du muscle ST est difficile à expliquer. Les caractéristiques structurales particulières de ce muscle, au grain de viande très grossier et très régulier, limitent peut-être l'effet de « dilution » du collagène dû au raccourcissement. Cet effet est maximal dans le cas d'une répartition homogène du tissu conjonctif. Par ailleurs le muscle ST est pratiquement le seul de la carcasse des bovins à contenir une quantité importante d'élastine. La présence de composants élastiques au niveau du tissu conjonctif peut également tendre à limiter, au niveau de la force de cisaillement du muscle cru, l'effet de dilution provoqué par le raccourcissement de la myofibrille. L'exemple du muscle ST montre combien peut être délicate l'interprétation des mesures de cisaillement sur muscle cru. Par contre, pour le dégustateur, le muscle ST affecté d'un degré de contraction de 25 p. 100 est significativement plus dur que le témoin non contracté.

En ce qui concerne la viande cuite, après 8 jours de conservation, les mesures de cisaillement ne révèlent pas de différences significatives entre muscles témoins et expérimentaux. Ceci résulte vraisemblablement du faible degré de contraction réel (tabl. 4) enregistré sur les muscles expérimentaux et non d'une inadaptation de la méthode de chauffage. On vérifie d'ailleurs que les moyennes des différences de force de cisaillement par couples (tabl. 6) varient dans le même sens que les degrés de contraction réels, mais ces différences sont trop faibles pour être significatives. A cela s'ajoute l'influence de l'élongation de certains muscles témoins, ce qui tend à durcir leur viande après cuisson (MARSH et CARSE, 1974). D'après ces auteurs, le durcissement serait maximal pour une élongation de 25 p. 100. Ceci doit contribuer à restreindre la différence de force de cisaillement entre témoins et expérimentaux enregistrée après cuisson pour les muscles RA et TFL dont les témoins subissent, sur la carcasse, une élongation d'environ 20 à 25 p. 100 (tabl. 4). L'ensemble de ces résultats nous conforte dans l'opinion que le jury de dégustateurs, surtout dans le cas de comparaisons par couples, est plus sensible que ne peuvent l'être les méthodes physiques de cisaillement sur muscle cuit pour révéler les consé-

quences de contractions limitées de la myofibrille sur la dureté de la viande.

Pour conclure, il nous apparaît que la technique que nous avons testée semble être une voie possible pour la mise en œuvre industrielle du désossage à chaud. L'obtention d'une qualité bactériologique satisfaisante nécessite le recours à une température de réfrigération relativement basse, ce qui, comme nous venons de le montrer, peut se répercuter d'une façon significative sur la tendreté de la viande. La température de + 10°C choisie pour procéder à l'installation de la *rigor mortis* nous semble constituer un bon compromis entre les exigences de la bactériologie et le souci de préserver les qualités organoleptiques de la viande. Le recours à une température plus élevée (+ 15°C) telle que celle utilisée par SCHMIDT et GILBERT (1970) obérerait vraisemblablement les possibilités de conservation, compte tenu du niveau de contamination initial que nous avons observé dans nos conditions expérimentales.

Reçu pour publication en novembre 1976.

REMERCIEMENTS

Nous remercions l'Institut technique de l'Élevage Bovin dont le concours a rendu possible la réalisation de cette expérimentation.

SUMMARY

AGING OF HOT DEBONED BEEF

This report studies the practical possibilities of hot deboning beef carcasses associated with vacuum packaging.

The authors confirm that when deboning at 2 hours *post mortem* is combined with vacuum packaging, refrigeration at + 10°C while *rigor mortis* sets in, and then storage at 0, + 2°C, the meat can be conserved in good microbiological conditions for 21 days. This technique causes extensive development of the lactic flora, a marked decrease in *Pseudomonas* growth and good control of *Microbacterium* growth.

As concerns meat quality, the technique does not increase weight loss during storage or at cooking and avoids weight loss during refrigeration.

The lenght of sarcomeres of hot deboned muscle is significantly shorter than that of muscle sarcomeres refrigerated on the carcass. This difference in contraction is expresses by differences in tendreness after 8 days of storage which tend to disappear the longer the meat is aged.

RESUMEN

EVOLUCION DE LAS CARACTERISTICAS DE TERNURA DE LOS MUSCULOS DE LOS BOVINOS, PUESTOS AL VACIO *ANTE RIGOR MORTIS*, DURANTE SU CONSERVACION

Esta investigacion tenia como intencion someter a prueba las posibilidades de utilizacion practica del deshuesado en caliente de las canales de los bovinos, al mismo tiempo que se realiza el embalaje al vacio de la carne.

Se ha verificado que la técnica que combina el deshuesado 2 horas *post mortem*, el embalaje al vacio de la carne, la refrigeracion en un ambiente a + 10° durante el comienzo del *rigor mortis*, seguida de un almacenaje a 0 + 2°C, permite, en el plano microbiologico, conservar la carne durante 21 dias en condiciones de higiene correctas. Esta técnica origina sobre todo un desarrollo

considerable de la flora lactica, una importante disminucion de los *Pseudomonas* y un buen control del crecimiento del *Microbacterium.*

En lo que se refiere a la calidad de la carne, la puesta en aplicacion de esta tecnologia no origina un aumento de las pérdidas de peso ni durante la conservacion ni en la coccion. Ademas, evita las pérdidas de peso del secado.

La longitud de los sarcomeros de los musculos deshuesados en caliente es mucho màs corta que la de los sarcomeros de los musculos refrigerados en la canal. Esta diferencia de grado de concentracion se manifiesta por diferencias importantes en la ternura después de ocho dias de conservacion, diferencias que tienden a desaparecer con el tiempo de maduracion de la carne.

RIASSUNTO

EVOLUZIONE, DURANTE LA CONSERVAZIONE, DELLE CARATTERISTICHE DI TENEREZZA DEI MUSCOLI DI BOVINI MESSI SOTTO VUOTO *ANTE RIGOR MORTIS*

Questo studio si proponeva di esaminare le possibilità di un impiego pratico di un disossamento a caldo delle carcasse bovine, associato all'imballaggio sotto vuoto della carne.

E' apparso che la tecnica che puo' combinare il disossamento 2 ore *post mortem*, l'imballaggio sotto vuoto della carne, la conservazione in un ambiente a + 10°C durante l'installazione della *rigor mortis* seguita da uno stoccaggio a 0, - + 2°C, permette, sul piano microbiologico, di conservare la carne durante 21 giorni in buone condizioni d'igiene. Questa tecnica permette in particolare : un rilevante sviluppo della flora lattica, un rallentamento sensibile della crescita degli *Pseudomonas* e un buon controllo della crescita di *Microbacterium.*

Per quanto riguarda la qualità della carne, questa procedura non fà aumentare le perdite di peso nè durante la conservazione nè durante la cottura. Essa evita inoltre le perdite di peso del rasciugamento.

La lunghezza dei sarcomeri dei muscoli disossati a caldo è positivamente più corta di quella dei sarcomeri dei muscoli raffreddatisi sulla carcassa. Questa differenza di graso di contrazione si traduce in sensibili differenze di tenerezza dopo otto giorni di conservazione e queste differenze tendono ad annullarsi a mano a mano che aumenta il tempo di maturazione della carne.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bendall J. R., 1969. Muscles, molecules and movement. Heinemann Educational Books, LTD London.

Bendall J. R., 1972. Consumption of oxygen by the muscles of beef animals and related species and its effect on the colour of meat. I. Oxygen consumption in pre-rigor muscle. *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 61-72.

Bendall J. R., 1975. Cold contracture and ATP turnover in red and white musculature of the pig, *post mortem. J. Sci. Food Agric.*, **26**, 55-71.

Billault J., Drieux H., Dumont B. L., Perron P., 1973. Désossage de la viande de bovins avant l'apparition de la rigidité cadavérique. *Rec. Med. Vet.*, 187-196.

Boccard R., Dumont B. L., Schmitt O., 1967. Note sur les relations entre la dureté de la viande et les principales caractéristiques du tissu conjonctif. *13th European Meeting of Meat Research Workers, Rotterdam.*

Falk S. N., Henrickson R. L., Morrison R. D., 1975. Effect of boning beef prior to chilling on meat tenderness. *J. Food Sci.*, **40**, 1075-1079.

Fournaud J., Sale P., Valin C., 1973. Conservation de la viande bovine sous emballage plastique, sous vide ou en atmosphère contrôlée. Aspects biochimiques et microbiologiques. 19e *Réunion européenne des chercheurs en viande*, Paris, tome I, 291-315.

Heinz G., 1975. Warmzerlegung von Rindfleisch mit anschliessen der Reifelagerung. *Fleisch.* 937-94 .

Herring H. K., Cassens R. G., Briskey. E. J., 1965. Further studies on bovine muscle tenderness as influence by carcass position, sarcomere length and fiber diameter. *J. Food Sci.*, **30**, 1049-1051.

Kastner C. L., Henrickson R. L., Morrison R. D., 1973. Characteristics of hot boned bovine muscle. *J. An. Sci.*, **36**, 484-484.

Kastner C. L., Russel T. S., 1975. Characteristics of conventionally and hot boned bovine muscle excised at various conditioning periods. *J. Food Sci.*, **40**, 747-750.

LOCKER R. H., 1960. Degree of musclar contraction as a factor in tenderness of beef. *Food Res.* **25**, 304-306.

LOCKER R. H., DAINES G. J., 1974. Cooking loss in beef. The effect of cold shortening, searing and rate of heating; time course and histology of changes during cooking. *J. Sci Food Agric.*, **25**, 1411-1418.

MARSH B. B., LEET N. G., 1966. Studies in meat tenderness. III. The effect of cold shortening in tenderness. *J. Food Sci.*, **31**, 450-459.

MARSH B. B., CARSE W. A., 1974. Meat tenderness and the sliding filament hypothesis. *J. Food Technol.*, **9**, 129-139.

RHODES D. N., DRANSFIELD E., 1974. Mechanical strength of raw beef from cold shortened muscles. *J. Sci. Food Agric.*, **25**, 1163-1164.

ROTH L. A., CLARK D. S., 1972. Growth of microbacterium thermosphactum on fresh beef. *18th Meeting of Meat Res. Workers*, Guelph.

SALE P., 1971. Évolution de quelques propriétés mécaniques du muscle pendant la maturation. *Bull. Techn. CRZV*, **6**, 35-44.

SCHMIDT G. R., GILBERT K. V., 1970. The effect of muscle excision before the onset of *rigor mortis* on the palatability of beef. *J. Food Technol.*, **5**, 331-338.

SCHMIDT G. R., KEMAN S., 1974. Hot boning and vacuum packaging of eight major bovine muscles. *J. Food Sci.*, **39**, 140-142.

TOURAILLE C., 1977. Comparaison des méthodes instrumentales et sensorielles d'appréciation de la tendreté de la viande (en préparation).

VALIN C., 1973. Conservation de la viande bovine réfrigérée. Transformation biochimique du muscle et qualité de la viande. 19e Réunion européenne des chercheurs en viande; tome I, 155-180.

VALIN C., LACOURT A., 1974. Action du froid sur les tissus musculaires des animaux abattus. *Rev. gen. Froid*, **10**, 1053-1065.

Ann. Technol. agric., 1976, **25** (4).

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1976

G. BEULLIER, J.-L. MULTON. — Distribution statistique des teneurs en eau dans une population de grain de maïs 1

M. BURET, Y. CHAMBROY, C. FLANZY. — Métabolisme anaérobie de la baie de raisin en milieu liquide. II. — Étude expérimentale 45

P. CARMONA, Juana BELLANTO, A. HIDALGO. — Étude d'huiles essentielles d'orange 159

Y. CHAMBROY, M. BURET, C. FLANZY. — Appareil pour le dosage conductimétrique du gaz carbonique dégagé par les organes végétaux 191

Y. CHILLIARD, P.-M. FEHR. — Activité lipolytique du lait de chèvre. I. — Mise en évidence d'une activité lipoprotéine-lipasique 219

Y. CHILLIARD, P.-M. FEHR. — Activité lipolytique du lait de chèvre. II. — Quelques variations physiologiques de l'activité lipoprotéine-lipasique. 231

P. COLONA, J.-P. MELCION, Christiane MERCIER. — Influence de l'irradiation infrarouge et de l'aplatissage sur la fragmentation, la composition du maïs-grain et sur l'état de son amidon 291

P. DUBOIS, Ph. SIMAND. — Recherche analytique de la betaïne dans les vins. 337

R. DUMAS de VAULX, S. AUBERT. — Caractéristiques biochimiques, qualité et aptitude à la conservation de Melons (Cantaloup charentais, cv. Doublon) cultivés sous serres 309

C. FLANZY, P. ANDRÉ, M. BURET, Y. CHAMBROY, P. GARCIA. — Voies de catabolisme du malate au cours du métabolisme anaérobie des baies de raisin 125

C. FLANZY, P. ANDRÉ, M. BURET, Y. CHAMBROY, M. FLANZY. — Évolution des substances azotées au cours du métabolisme anaérobie de la baie du raisin 175

T. IVANOV, M. MARINOV. — Influence de la fermentation continue sous pression de Co_2 sur la composition des vins destinés à la distillation... 239

M. LAROCHE, P. SALÉ. — Quelques aspects du comportement mécanique de protéines de Tournesol filées. Influence de divers adjuvants et liants simples 143

A. LATRASSE, B. GAUTIER. — Analyses biométriques de quelques caractéristiques variétales du Framboisier en vue de la mécanisation de la récolte 97

Joëlle LE MAO, R.-O. PRUDHOMME. — Action des ultrasons sur la fermentation alcoolique de la mélasse de betterave par *Saccharomyces cerevisiae*. 117

M. MOUTOUNET. — Les caroténoïdes de la Prune d'Ente et du Pruneau d'Agen 73

M. MOUTOUNET. — La polyphénoloxydase de la Prune d'Ente, modification de son activité au cours de l'élaboration du Pruneau d'Agen 343

D. RICHARD-MOLARD, B. CAHAGNIER, J. POISSON, R. DRAPRON. — Évolutions comparées des constituants volatils et de la microflore de maïs stockés sous différentes conditions de température et d'humidité 29

S. SECK., J. CROUZET, Marie-Thérèse PIVA. — Influence des traitements thermiques sur la nature des constituants volatils de la Tomate 85

A.-A. THIAM., R. DRAPRON, D. RICHARD-MOLARD. — Causes d'altération des farines de mil et de sorgho 253

C. VALIN, J. FOURNAUD, A. LACOURT, C. TOURAILLE. — Évolution, en cours de conservation, des caractéristiques de tendreté de muscles de bovins sous vide *Ante rigor mortis* 357

Mise au point.

P. FEILLET. — Les albumines et globulines du blé 203

Mise au point bibliographique.

A. BORIES. — Le carbone organique total. Méthodes modernes de mesure et intérêt de la détermination dans les eaux résiduaires 273

Chronique de Livres 115, 217

CONTENTS OF YEAR 1976

G. BEULLIER, J.-L. MULTON. — Statistical distribution of the water contents in a maize grain population 1

M. BURET, Y. CHAMBROY, C. FLANZY. — Metabolism in grape berries immersed in a liquid medium. II. — Experimental study 45

P. CARMONA, Juana BELLANTO, A. HIDALGO. — Study of orange essential oils. II. — Chemical modifications during aging 159

Y. CHAMBROY, M. BURET, C. FLANZY. — Device designed for the conductimetric measurement of the Co_2 emitted by plant organs 191

Y. CHILLIARD, P.-M. FEHR. — Goat milk lipolytic activity. I. — Evidences for a lipoprotein lipase activity 219

Y. CHILLIARD, P.-M. FEHR. — Goat milk lipolytic activity. II. — Influence of some physiological factors on the lipoprotein lipase activity 231

P. COLONA, J.-P. MELCION, Christiane MERCIER. — Influence of the micronization process on the composition and fragmentation of Maize kernel and the structure of Maize starch 291

P. DUBOIS, Ph. SIMAND. — Quantitative analysis of betaine in wines 337

R. DUMAS de VAULX, S. AUBERT. — Biochemical characteristics quality and storage of melons (cv. Doublon, Cantaloup Charentais type) harvested in greenhouse 309
C. FLANZY, P. ANDRÉ, M. BURET, Y. CHAMBROY, P. GARCIA. — Processes of malate catabolism during the anaerobie metabolism of grap berries. 125
C. FLANZY, P. ANDRÉ, M. BURET, Y. CHAMBROY, M. FLANZY. — Evolution of the nitrogen substances during the anaerobic metabolism of grapes berries 175
T. IVANOV, M. MARINOV. — Influence of continuous fermentation under Co_2 pressure on composition of wines intented for distillation 239
M. LAROCHE, P. SALÉ. — Mechanical behaviour of spun sunflower proteins: effects of adjuvants and binding materials 143
A. LATRASSE, B. GAUTIER. — Biometry analyses of some varietal characteristics of Raspberry with a view to mechanical harvesting 97
Joëlle LE MAO, R.-O. PRUDHOMME. — Influence of ultrasounds on the alcoholic fermentation of beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*... 117
M. MOUTOUNET. — The carotenoids of plum and prune 73
M. MOUTOUNET. — The plum polyphenoloxidase modification of its activity during the prune manufacture 343
D. RICHARD-MOLARD, B. CAHAGNIER, J. POISSON, R. DRAPRON. — Volatile compounds and grain microflora 29
S. SECK, J. CROUZET, Marie-Thérèse PIVA. — Influence of the heat treatments on the nature of tomato volatile compounds 85
A.-A. THIAM, R. DRAPRON, D. RICHARD-MOLARD. — Causes of deterioration in stored flours of millet and sorghum 253
C. VALIN, J. FOURNAUD, A. LACOURT, C. TOURAILLE. — Aging of hot deboned beef 357

Mise au point.

P. FEILLET. — Wheat albumins and globulins 203

Bibliographical review.

A. BORIES. — Total organic carbon. Modern methods for measuring and advantage of the determination in waste water 273
Book reviews 115, 217

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire* : il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences; d) *résultats,* à présenter de la manière la plus brève possible; e) *discussion et conclusion*; f) *titre et résumé* en anglais ou destinés à être traduits en anglais comportant une analyse *complète* de l'article; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (DUPONT et DUVAL, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivis (s) des initiales du (des) prénom (s); la date de parution de l'article; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées); le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals,* ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom; la date de l'édition; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine); le volume; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos : 9 × 12 ; 4 photos : 9 × 5,5; 6 photos : 5,5 × 5,5. Dans ce cas chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible aprés clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

Envoi du manuscrit : M. BOURDET, Laboratoire de Technologie des Blés, 16, rue Nicolas-Fortin, 75013 Paris, ou M. DUPUY, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, Centre de Recherches de Dijon, 21034 Dijon Cedex. On demande deux exemplaires.

Correction des épreuves : les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à Mme COLLON.

TECHNOLOGIE AGRICOLE.

Le Directeur de la publication : M.-L. Cagnac

IMPRIMERIE NATIONALE

Dépôt légal : 1er trimestre 1977. N° 6.036.066.5

CPPAP n° 26.375.

P-11
9/12
CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES
SERVICE DE DOCUMENTATION
- 1 DEC. 1977
VERSAILLES

annales de technologie agricole

Trimestriel

1977

Vol. 26 . N° 1

inra

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Ann. Technol. Agric. ATAPAA (1) 1-115 (1977)
FR. ISSN 0003-4223

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

149, rue de Grenelle, 75007 PARIS, Tél. : 551-41-09.

Directeur général : R. FÉVRIER

Directeur général adjoint : J. POLY

Inspecteurs généraux : E. BILIOTTI, R. BOUCHET, P. BOUVAREL, C. CALET, A. CAUDERON, G. FAUCONNEAU, G. JOLIVET, R. PÉRO

Rédaction des Annales

Pour l'ensemble des Séries : J. POLY

Annales agronomiques.

— J. CHAUSSIDON, Chef du Département de Science du sol, C.N.R.A.
— L. GACHON, Chef du Département d'Agronomie, 63100 Clermont-Ferrand.
— M. HALLAIRE, Chef du Département de Bioclimatologie, C.N.R.A.

Annales de l'Amélioration des Plantes.

— M. RIVES, Chef du Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes, I.N.R.A., 11, rue Jean-Nicot 75007 Paris.

Annales de Phytopathologie.

— J. PONCHET, Chef du Département de Pathologie végétale, 06602 Antibes.

Annales de Zoologie-Écologie animale.

— E. BILIOTTI, Inspecteur général de la Recherche agronomique.

Annales de Zootechnie.

— A.-M. LEROY, Professeur honoraire à l'Institut national agronomique.
— A. RÉRAT, Chef du Département de Nutrition, C.N.R.Z.

Annales de Technologie agricole.

— P. DUPUY, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, 21034 Dijon Cedex.
— A. GUILBOT, Directeur scientifique du Centre de Recherches de Nantes, 44076 Nantes
— B. L. DUMONT, Directeur du Laboratoire de Recherches sur la Viande, C.N.R.Z.
— A. BOURDET, Directeur du Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, I.N.R.A., 16, rue N.-Fortin, 75013 Paris.

Annales des Sciences forestières.

— P. BOUVAREL, Inspecteur général de la Recherche agronomique, Chef du Département de Recherches forestières, C.N.R.F.
— J. PARDÉ, Directeur de la Station de Sylviculture et de Production. C.N.R.F.

Annales de Génétique et de Sélection animale.

— P. MÉRAT, Directeur de la Station de Génétique factorielle. C.N.R.Z.
— B. VISSAC, Chef du Département de Génétique animale, C.N.R.Z.

Apidologie (Revue franco-allemande, co-édition I.N.R.A.-Deutscher-Imkerbund).

— J. LOUVEAUX, Directeur de la Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes sociaux, 91440 Bures-sur-Yvette.

Annales de Recherches vétérinaires.

— P. LARVOR, Directeur du Laboratoire des Maladies métaboliques, Theix, Saint-Genès-Champanelle, 63110 Beaumont.

Annales d'Hydrobiologie.

— J. LECOMTE, Chef du Département d'Hydrobiologie, C.N.R.A.

Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique. Pour les « Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique » Administration et secrétariat de la Rédaction à l'adresse suivante : « Secrétariat des A.B.A.B.B., I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas ».

— C. THIBAULT, Directeur de Recherches à l'I.N.R.A., C.N.R.Z.

ADMINISTRATION ET SECRÉTARIAT DE LA RÉDACTION

Service des Publications de l'I.N.R.A., route de Saint-Cyr, 78000 VERSAILLES, Tél. : 950-75-22

TABLE DES MATIÈRES

A. J. COURTOISIER : Dosage complexométrique du calcium et du magnésium par utilisation conjuguée de deux agents complexants. Application du vin 1

F. SAUZE : Étude du taux d'oxygène dissous et de divers paramètres dans un effluent d'eaux résiduaires domestiques traité par lagunage . 25

F. SAUZE : Étude du coefficient de vitesse de dégradation caractérisant l'évolution des eaux polluées lagunées. Dégradation des charges organiques 39

B. CAHAGNIER, J. P. MELCION, Cuc N'GUYEN THI, Jeanne POISSON, J. ROUGEOT : Stockage d'aliments composés pour rats et visons après addition d'agents conservateurs évolution microbiologique . 59

Mise au point bibliographique :

Jutta CERNING-BEROARD, Christiane MERCIER, A. GUILBOT : Composition glucidique du blé . 79

CONTENTS

A. J. COURTOISIER : Complexometric titration of calcium and magnesium by the joint action of two chelating agents and its application to wine 1

F. SAUZE : Study of the dissolved oxygen rate and some other parameters in a waste effluent after lagoonal treatment. 25

F. SAUZE : Study of the degradation speed coefficient as a characteristic of the lagooned waste water evolution . 39

B. CAHAGNIER, J. P. MELCION, Cuc N'GUYEN THI, Jeanne POISSON, J. ROUGEOT : The storage of composed foods for rats and minks after addition of preserving agents. Microbiological evolution . 59

Bibliographical review :

Jutta CERNING-BEROARD, Christiane MERCIER, A. GUILBOT : Wheat carbohydrate composition . 79

Les annales de Technologie agricole figurent dans Curren Contents

I. N. 7. 036. 043. 5.

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

PÉRIODIQUES

TARIF DES ABONNEMENTS POUR 1977	France	Étranger	Le N°
ANNALES AGRONOMIQUES, 6 n^{os} par an	270 F	296 F	65 F
ANNALES DE L'AMÉLIORATION DES PLANTES, 6 n^{os} par an	210 F	232 F	65 F
ANNALES DE PHYTOPATHOLOGIE, 4 n^{os} par an	240 F	264 F	85 F
ANNALES DE ZOOLOGIE-ÉCOLOGIE ANIMALE, 4 n^{os} par an.	240 F	264 F	85 F
ANNALES DE ZOOTECHNIE, 4 n^{os} par an	240 F	264 F	85 F
ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE, 4 n^{os} par an	210 F	232 F	65 F
ANNALES DES SCIENCES FORESTIÈRES, 4 n^{os} par an	210 F	232 F	65 F
ANNALES DE GÉNÉTIQUE ET DE SÉLECTION ANIMALE, 4 n^{os} par an	240 F	264 F	85 F
ANNALES DE RECHERCHES VÉTÉRINAIRES, 4 n^{os} par an	240 F	264 F	85 F
ANNALES D'HYDROBIOLOGIE, 2 n^{os} par an	125 F	140 F	85 F
ANNALES DE BIOLOGIE ANIMALE, BIOCHIMIE, BIOPHYSIQUE, 6 n^{os} par an (1) .	270 F	296 F	65 F

(1) Les abonnements aux *Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique* doivent être adressés à : « Secrétariat des A.B.A.B.B., I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas ».

APIDOLOGIE, 4 n^{os} par an — Abonnement : France : 60 F — Étranger sauf R.F.A. : 70 F
— Le numéro : France : 20 F — Étranger sauf R.F.A. : 25 F

DERNIERS OUVRAGES PARUS

Carte pédologique de France à 1/100 000. Privas N-19 et notice explicative, par M. Bornard, J. P. Legros, J. Moinereau.
225 p. et une carte, 1977. 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Dijon O-12 et notice explicative par J. Chrétien.
218 p. et une carte, 1976 . 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Condon H-21 et notice explicative, par J. Séguy.
152 p. et une carte, 1975 . 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Angoulême H-16 et notice explicative, par G. Callot.
171 p. et une carte, 1975 . 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Moulins L-14 et notice explicative, par J. C. Favrot.
177 p. et une carte, 1974 . 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Toulon P-23 et notice explicative, par J. Portier.
107 p. et une carte, 1974 . 53,50 F

Journées d'information sur l'alimentation azotée des animaux, Paris, 21-22 novembre 1973.
141 p., 1974 . 52,00 F

L'I.N.R.A. au service des Industries agricoles et alimentaires. Inventaire des Recherches.
266 p., 1974 . 35,00 F

Symposium international sur la conservation des grains récoltés humides, Paris, 5-10 mars 1973.
762 p., 1973 . 150,00 F

Le Pois. Étude génétique des caractères, classification, caractéristiques variétales portant sur les variétés inscrites au catalogue officiel français, par R. Cousin.
111 p. et 140 fiches, 1974 . 150,00 F

Contribution à l'étude de la Faune de France. Systématique de la tribu des Scymnini (Coccinellidae), par J. M. Gourreau.
223 p., 1974 . 85,00 F

Les arbres et arbrisseaux acclimatés en région méditerranéenne française. Catalogue commenté, par P. Augé, P. Allemand, R. Hamès.
144 p., 1973 . 58,85 F

Colloque sur l'ovogenèse et la folliculogenèse, Nouzilly, 14-16 décembre 1972.
258 p., 1973 . 120,00 F

Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales, Versailles, 11-15 septembre 1972. Coédition I.N.R.A.-C.N.R.S.
549 p., 1973 . 160,50 F

Recherches acridiennes à Madagascar.
262 p., 1972 . 80,00 F

IV^{e} Conférence du groupe international d'étude des virus et des maladies à virus de la vigne, Colmar 16-18 juin 1970.
211 p., 1972 . 60,00 F

Les demandes d'abonnements (à l'exception des abonnements aux Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique) et les commandes doivent être adressées au Service des Publications de l'Institut national de la Recherche agronomique, route de Saint-Cyr, 78000 Versailles.
Règlement : par chèque bancaire à l'ordre du Régisseur des Publications de l'I.N.R.A., par virement postal à son compte courant : 9064-43 Paris, sans mentionner d'adresse, ou par bons U.N.E.S.C.O.
Les demandes peuvent être souscrites également par l'intermédiaire des libraires dans les conditions habituelles.

Ann. Technol. agric., 1977, **26** (2).

TABLE DES MATIÈRES

Mémoires originaux

J. NICOLAS, R. DRAPRON. — Quelques caractéristiques physico-chimiques de la lipoxygénase de la fève (*Vicia faba L.*) 119

W. GROSCH, F. WEBER, K. H. FISCHER. — Décoloration des caroténoïdes par la lipoxygénase 133

N. A. M. ESKIN, H. M. HENDERSON. — Une étude de la lipoxygénase de lentilles et de lupins 139

H. W. GARDNER, D. J. SESSA. — Comparaison des modes de dégradation des hydroperoxydes d'acides gras par les céréales et une légumineuse 151

R. DUDEN, K. H. PARK, A. FRICKER. — Détermination des activités phospho- et galactolipasiques dans un matériel végétal 161

R. BROCKMANN, L. ACKER. — Activité de la lipoxygénase et activité de l'eau dans les systèmes à faible teneur en eau 167

J.F.G. VLIEGENTHART, G. A. VELDINK. — Sur le mécanisme des réactions catalysées par la lipoxygénase des plantes 175

R. BITTEL, A. FOURCY, B. GODON, G. MOURIOUX. — Transfert de métaux lourds dans la chaîne de panification 189

G. ALBAGNAC, J. N. MORFAUX. — Composition de la fraction glucidique des eaux de fabrication de panneaux de fibre à partir de bois de feuillus 199

Note technique

J. C. NOEL, J. P. VELLAUD. — Prévention et lutte contre les pollutions et nuisances des industries de la canne à sucre 215

Chronique des Livres 225

CONTENTS

J. NICOLAS, R. DRAPRON. — Some physicochemical characteristics of horse bean lipoxygenase (*Vicia faba* L.) 119

W. GROSCH, F. WEBER, K. H. FISCHER. — Bleaching of carotenoids by the enzyme lipoxygenase 133

N. A. M. ESKIN, H. M. HENDERSON. — A study of lipoxygenase from lentils and lupins 139

H. W. GARDNER, D. J. SESSA. — Degradation of fatty acid hydroperoxides by cereals and a legume: a comparison 151

R. DUDEN, K. H. PARK, A. FRICKER. — Determination of phospho-and galactolipase activities in vegetable material 161

R. BROKMANN, L. ACKER. — Lipoxygenase activity and water activity in systems of low water content 167

J. F. G. VLIEGENTHART, G. A. VELDINK. — On the mechanism of the reactions catalysed by plant lipoxygenase 175

R. BITTEL, A. FOURCY, B. GODON, G. MOURIOUX. — Transfer of heavy metals in the baking chain 189

G. ALBAGNAC, J. N. MORFAUX. — Composition of the carbohydrate fraction of waste waters from fibre panels manufacture with leafy woods 199

Technical note :

J. C. NOEL, J. P. VELLAUD. — Prevention and strife against pollution and harmfulners caused by the cane sugar industry 215

Books review 225

Les Annales de Technologie agricole figurent dans Current Contents

I.N. 7.036.044.5

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

PÉRIODIQUES

TARIF DES ABONNEMENTS POUR 1977	France	Étranger	Le N°
ANNALES AGRONOMIQUES, 6 n^{os} par an	270 F	296 F	65 F
ANNALES DE L'AMÉLIORATION DES PLANTES, 6 n^{os} par an	210 F	232 F	65 F
ANNALES DE PHYTOPATHOLOGIE, 4 n^{os} par an	240 F	264 F	85 F
ANNALES DE ZOOLOGIE-ÉCOLOGIE ANIMALE, 4 n^{os} par an	240 F	264 F	85 F
ANNALES DE ZOOTECHNIE, 4 n^{os} par an	240 F	264 F	85 F
ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE, 4 n^{os} par an	210 F	232 F	65 F
ANNALES DES SCIENCES FORESTIÈRES, 4 n^{os} par an	210 F	232 F	65 F
ANNALES DE GÉNÉTIQUE ET DE SÉLECTION ANIMALE, 4 n^{os} par an	240 F	264 F	85 F
ANNALES DE RECHERCHES VÉTÉRINAIRES, 4 n^{os} par an	240 F	264 F	85 F
ANNALES D'HYDROBIOLOGIE, 2 n^{os} par an	125 F	140 F	85 F
ANNALES DE BIOLOGIE ANIMALE, BIOCHIMIE, BIOPHYSIQUE, 6 n^{os} par an (1)	270 F	296 F	65 F

(1) Les abonnements aux *Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique* doivent être adressés à : « Secrétariat des A.B.A.B.B., I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas ».

APIDOLOGIE, 4 n^{os} par an — Abonnement : France : 60 F — Étranger sauf R.F.A. : 70 F
— Le numéro : France : 20 F — Étranger sauf R.F.A. : 25 F

DERNIERS OUVRAGES PARUS

Carte pédologique de France à 1/100 000. Privas N-19 et notice explicative, par **M. Bornard, J. P. Legros, J. Moinereau.**
225 p. et une carte, 1977 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Dijon O-12 et notice explicative par **J. Chrétien.**
218 p. et une carte, 1976 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Condon H-21 et notice explicative, par **J. Séguy.**
152 p. et une carte, 1975 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Angoulême H-16 et notice explicative, par **G. Callot.**
171 p. et une carte, 1975 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Moulins L-14 et notice explicative, par **J. C. Favrot.**
177 p. et une carte, 1974 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Toulon P-23 et notice explicative, par **J. Portier.**
107 p. et une carte, 1974 53,50 F

Journées d'information sur l'alimentation azotée des animaux, Paris, 21-22 novembre 1973.
141 p., 1974 52,00 F

L'I.N.R.A. au service des Industries agricoles et alimentaires. Inventaire des Recherches.
266 p., 1974 35,00 F

Symposium international sur la conservation des grains récoltés humides, Paris, 5-10 mars 1973.
762 p., 1973 150,00 F

Le Pois. Étude génétique des caractères, classification, caractéristiques variétales portant sur les variétés inscrites au catalogue officiel français, par **R. Cousin.**
111 p. et 140 fiches, 1974 150,00 F

Contribution à l'étude de la Faune de France. Systématique de la tribu des Scymnini (Coccinellidae), par **J. M. Gourreau.**
223 p., 1974 85,00 F

Les arbres et arbrisseaux acclimatés en région méditerranéenne française. Catalogue commenté, par **P. Augé, P. Allemand, R. Hamès.**
144 p., 1973 58,85 F

Colloque sur l'ovogenèse et la folliculogenèse, Nouzilly, 14-16 décembre 1972.
258 p., 1973 120,00 F

Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales, Versailles, 11-15 septembre 1972. Coédition I.N.R.A.-C.N.R.S.
549 p., 1973 160,50 F

Recherches acridiennes à Madagascar.
262 p., 1972 80,00 F

IV^e Conférence du groupe international d'étude des virus et des maladies à virus de la vigne, Colmar 16-18 juin 1970.
211 p., 1972 60,00 F

Les demandes d'abonnements (à l'exception des abonnements aux Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique) et les commandes doivent être adressées au Service des Publications de l'Institut national de la Recherche agronomique, route de Saint-Cyr, 78000 Versailles.
Règlement : par chèque bancaire à l'ordre du Régisseur des Publications de l'I.N.R.A., par virement postal à son compte courant : 9064-43 Paris, sans mentionner d'adresse, ou par bons U.N.E.S.C.O.
Les demandes peuvent être souscrites également par l'intermédiaire des libraires dans les conditions habituelles.

Ann. Technol. agri., 1977, **27** (3), 373.

Contents

R. Dumas de Vaulx, S. Aubert. — Evolution of the fruits of two cultivars of Muskmelon, « Doublon » and « Vedrantais » (« *Charentais* » *type*), in the last days before maturity 227

S. Aubert, R. Dumas de Vaulx. — Undestructive firmness test for the maturity controll of melons . 243

R. Maret et T. Sozzi. — Malolactic flora of musts and wines from the Canton of Valais (Switzerland). I. — Lactobacilli and Pediococci 255

Andrée Ournac, C. Poux, P. André, M. Buret, Y. Chambroy, C. Flanzy. — Vitamine C evolution during the anaerobic metabolism of grapes 275

Annie Card et C. L. Avisse. — Comparative study of the aroma of raw and cooked mushrooms (*Agaricus bisporus* L.) . 287

H. E. Pattee and J. A. Singleton. — Isolation of positional and geometrical isomers of hydroperoxides and the evaluation of the effects of selected parameters of their ratio 1, 2, 3 . 295

M. Laroche. — Mechanical behaviour of spun soya protein: effect of water, sodium and calcium chloride . 305

Communications presented at the third international IUPAC symposium about mycotoxines in alimentation. Paris, September 16-18, 1976.

J. Pelhate. — Protection of silage feed against fungic spoliation 319

C. Giddey, J. Brandt, G. Bunter. — The detoxification of oil-seed cakes polluted by Aflatoxins. Research and development of an industrial process 331

D. M. Wilson, E. Jay, O. M. Hale, L. H. Huang. — Controlled atmosphere storage of high moisture corn and peanuts to control aflatoxin production 339

R. E. Pettit, R. A. Taber, O. D. Smith, B. L. Jones. — Reduction of mycotoxin contamination in peanuts through resistant variety development 343

M. C. Dieckert, J. W. Dieckert. — Genetically determined structural parameters of the seed coat affecting the colonization of peanut seeds by aflatoxin producing Aspergilli 353

B. Lesieur, J. Colin. — Development of an industrial process for the treatment of peanut meals contaminated by Aflatoxine 367

TABLE DES MATIÈRES

MÉMOIRES ORIGINAUX

R. Tomassone, C. Flanzy. — Présentation synthétique de diverses méthodes d'analyse de données fournies par un jury de dégustateurs . 373

M. Renerre. — Purification rapide et sous forme non oxydée de la myoglobine des viandes de bovins, ovins, et porcins . 419

M. Feuillat, P. Bidan, Y. Rosier. — Croissance des bactéries lactiques à partir des principaux constituants azotés du vin . 435

M. Marinov, T. Ivanov. — Influence de la fermentation continue sous pression de CO_2 sur la composition des eaux-de-vie de vin . 449

P. Varoquaux, J. Sarris, G. Albagnac. — Dosage spectrophotométrique automatique de l'activité *o*-diphenoloxydasique du champignon de Paris (*Agaricus Bisporus L.*) . . . 461

P. Varoquaux, J. Sarris, G. Albagnac. — Action des antioxydants et de la chaleur sur l'*o*-diphénoloxydase du champignon de Paris (*Agaricus Bisporus L.*) 473

G. Vanghessdaele, Nicole Fournier. — Origine et rôle du cuivre et du fer dans la fabrication de la moutarde de Dijon . 487

G. Vangheesdaele, Nicole Fournier. — La dégradation des thioglucosides par les sels de cuivre (application au dosage de la sinigrine dans les graines de moutarde) 499

J. P. Touzel, J. N. Morfaux. — Épuration biologique en pilotes de laboratoire des liqueurs noires de papeteries kraft . 511

CONTENTS

R. Tomassone, C. Flanzy. — Survey of the methods of analysis of taste panel data . . . 373

M. Renerre. — Fast preparation of unoxydised myoglobin from bovine, ovine and pork muscle . 419

M. Feuillat, P. Bidan, Y. Rosier. — Growth of lactic bacteria from wine main nitrogen components. 435

M. Marinov, T. Ivanov. — Influence of continuous fermentation under CO_2 pressure on wine-spirits composition . 449

P. Varoquaux, J. Sarris, G. Albagnac. — Automatcd spectrophotometric determination of *o*-diphenoloxidase activity in common mushroom (*Agaricus Bisporus L.*) 461

P. Varoquaux, J. Sarris, G. Albagnac. — Effect of antioxidants and heat on *o*-diphenoloxydase of common mushroom (*Agaricus Bisporus L.*). 485

G. Vangheesdaele, Nicole Fournier. — Origin and influence of iron and copper during the preparation of the Dijon mustard paste . 487

G. Vangheesdaele, Nicole Fournier. — Thioglucosique degradation by copper salts : (application to the quantitative analysis of sinigrine in mustard seeds) 499

J. P. Touzel, J. N. Morfaux. — Biological treatment in pilot-plants of black liquors from Kraft paper factories . 511

Les annales de Technologie agricole figurent dans Current Contents

I. N. 7. 036. 046. 5

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

PÉRIODIQUES

TARIF DES ABONNEMENTS POUR 1978	France	Étranger	Le N°
ANNALES AGRONOMIQUES, 6 n^{os} par an	287 F	315 F	69 F
ANNALES DE L'AMÉLIORATION DES PLANTES, 6 n^{os} par an	287 F	315 F	69 F
ANNALES DE PHYTOPATHOLOGIE, 4 n^{os} par n	254 F	281 F	90 F
ANNALES DE ZOOLOGIE-ÉCOLOGIE ANIMALE, 4 n^{os} par an.	254 F	281 F	90 F
ANNALES DE ZOOTECHNIE, 4 n^{os} par an	254 F	281 F	90 F
ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE, 4 n^{os} par an	223 F	247 F	69 F
ANNALES DES SCIENCES FORESTIÈRES, 4 n^{os} par an	223 F	247 F	69 F
ANNALES DE GÉNÉTIQU ET DE SÉLECTION ANIMALE, 4 n^{os} par an	254 F	281 F	90 F
ANNALES DE RECHERCHES VÉTÉRINAIRES, 4 n^{os} par an	254 F	281 F	90 F
ANNALES D'HYDROBIOLOGIE (2)			
ANNALES DE BIOLOGIE ANIMALE, BIOCHIMIE, BIOPHYSIQUE, 6 n^{os} par an (1) .	300 F	330 F	65 F

(1) Les abonnements aux Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique doivent être adressés à : « Secrétariat des A.B.A.B.B., I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas ».
(2) Les Annales d'Hydrobiologie cessent de paraître en 1978.

APIDOLOGIE, 4 n^{os} par an — Abonnement : France : 64 F — Étranger sauf R.F.A. : 75 F
— Le numéro : France : 21 F — Étranger sauf R.F.A. : 25 F

DERNIERS OUVRAGES PARUS

Les Rongeurs de France. Faunistique et Biologie, par **H. Le Louarn** et **M. C. Saint Gyrons.**
164 p., 1977 . 80,00 F

Carte pédologique de France à 1/100.000. Privas N-19 et Notice explicative par **M. Bornand, J.P. Legros, J. Moinereau**
254 p. et une carte . 53,50

Carte pédologique de France à 1/100 000. Dijon O-12 et notice explicative, par **J. Chretien.**
218 p. et une carte, 1977 . 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Condom H-21 et notice explicative, par **J. Séguy.**
152 p. et une carte, 1975 . 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Angoulême H-16 et notice explicative, par **G. Callot.**
171 p. et une carte, 1975 . 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Moulins L-14 et notice explicative, par **J. C. Favrot.**
177 p. et une carte, 1974 . 53,50 F

Carte pédologique de France à 1/100 000. Toulon P-23 et notice explicative, par **J. Portier**
107 p. et une carte, 1974 . 53,50 F

Journées d'information sur l'alimentation azotée des animaux, Paris, 21-22 novembre 1973.
141 p., 1974 . 52,00 F

L'I.N.R.A. au service des Industries agricoles et alimentaires. Inventaire des Recherches.
266 p., 1974 . 35,00 F

Symposium international sur la conservation des grains récoltés humides, Paris, 5-10 mars 1973.
762 p., 1973 . 150,00 F

Le Pois. Étude génétique des caractères, classification, caractéristiques variétales portant sur les variétés inscrites au catalogue officiel français, par **R. Cousin.**
111 p. et 140 fiches, 1974 . 150,00 F

Contribution à l'étude de la Faune de France. Systématique de la tribu des Scymnini (Coccinellidae), par **J. M. Gourreau.**
223 p., 1974 . 85,00 F

Les arbres et arbrisseaux acclimatés en région méditerranéenne française. Catalogue commenté, par **P. Augé, P. Allemand, R. Hamès.**
144 p., 1973 . 58,85 F

Colloque sur l'ovogenèse et la folliculogenèse, Nouzilly, 14-16 décembre 1972.
258 p., 1973 . 120,00 F

Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales, Versailles, 11-15 septembre 1972. Coédition I.N.R.A.-C.N.R.S.
549 p., 1973 . 160,50 F

Recherches acridiennes à Madagascar.
262 p., 1972 . 80,00 F

IV^{e} Conférence du groupe international d'étude des virus et des maladies à virus de la vigne, Colmar 16-18 juin 1970.
211 p., 1972 . 60,00 F

Flore illustrée des Phanérogames de Guadeloupe et de Martinique, par **J. Fournet.**
1652 p., 1978 . 300.00 F

Les demandes d'abonnements (à l'exception des abonnements aux Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique) et les commandes doivent être adressées au Service des Publications de l'Institut national de la Recherche agronomique, route de Saint-Cyr, 78000 Versailles.
Règlement : par chèque bancaire à l'ordre du Régisseur des Publications de l'I.N.R.A., par virement postal à son compte courant : 9064-43 Paris, sans mentionner d'adresse, ou par bons U.N.E.S.C.O.
Les demandes peuvent être souscrites également par l'intermédiaire des libraires dans les conditions habituelles.

annales de technologie agricole

Trimestriel

1977

Vol. 26 - N° 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (1), 1-23.

Dosage complexométrique du Calcium et du Magnésium par utilisation conjuguée de deux agents complexants Application au vin

A. J. COURTOISIER

avec la collaboration technique de Fabienne FORESTIER et A. REY

Laboratoire de Chimie et de Technologie,
E.N.I.T.A. de Bordeaux,
1, cours du Général-de-Gaulle
33170 Gradignan

Résumé

Le dosage complexométrique du calcium seul et du calcium en présence du magnésium est étudié théoriquement et réalisé en utilisant un agent complexant, l'acide éthylèneglycol, bis amino-2 oxyde d'éthyle, N, N' tétracétique (EGTA). On montre que, dans le cas de la détermination du calcium en présence de magnésium, l'élimination de celui-ci n'est pas nécessaire.

Le dosage complexométrique du calcium et du magnésium met en œuvre l'EGTA et un deuxième agent complexant qui est le sel disodique de l'acide éthylènediaminotétracétique (EDTA).

Ces méthodes sont appliquées au dosage du calcium et du magnésium dans le vin. Tous les résultats font l'objet d'une analyse statistique.

On constate une très bonne précision et une très bonne exactitude des résultats dans les solutions simples et une précision et une exactitude satisfaisantes dans le vin.

L'amélioration est très sensible par rapport à la méthode classique avec l'EDTA.

Mots clés : *Complexométrie calcium, magnésium, EGTA, EDTA, vin.*

I. — Introduction

Les travaux de base de SCHWARZENBACH (1956), de PRIBIL (1957), de BJERRUM *et al.* (1958) et de FLASCHKA (1959) ont montré la possibilité de détermination complexométrique du calcium et du magnésium avec le sel disodique de l'acide éthylènediaminotétracétique (EDTA). Mais les constantes de stabilité des complexes formés respectivement avec le calcium et avec le magnésium sont trop peu différentes pour permettre un dosage sélectif des deux éléments en mélange. Par contre, avec cet agent complexant, on peut déterminer ensemble calcium et

magnésium de façon satisfaisante et le calcium seul en présence du magnésium, en éliminant celui-ci par précipitation sous forme d'hydroxyde à pH 12.

Cette dernière méthode donne des résultats peu précis en raison de la précipitation partielle du calcium avec l'hydroxyde de magnésium et de l'existence du précipité d'hydroxyde de magnésium qui donne lieu à l'équilibre constant avec les ions Mg^{2+} et empêche un virage net et persistant de l'indicateur métallochrome, ceci quel que soit l'indicateur métallochrome utilisé. En effet, on peut montrer facilement que, pour cette valeur de la concentration en magnésium, on se trouve dans la zone de virage de l'indicateur métallochrome.

Pour pallier ces difficultés de dosage du calcium et du magnésium en mélange, SCHWARZENBACH (1956) a proposé un nouvel agent complexant : l'acide éthylène-glycol, bis amino-2 oxyde d'éthyle, N, N′ tétracétique (EGTA).

Ses constantes de stabilité respectives avec le calcium et le magnésium sont :

$$\log K_{CaY} = 11{,}0 \qquad \text{et} \qquad \log K_{MgY} = 5{,}2.$$

CaY et MgY représentent les formules des complexes du calcium et du magnésium avec EGTA désigné par Y. Elles autorisent les dosages sélectifs de ces deux métaux en mélange, à condition de disposer d'indicateurs de fin de réaction convenables.

SCHMID et REILLEY (1957) ont proposé une méthode potentiométrique utilisant une électrode de mercure indicatrice pour doser le calcium en présence du magnésium. RINGBOM *et al.* (1958), SADEK *et al.* (1959) ont étudié théoriquement la possibilité de détecter visuellement la fin de la réaction au moyen d'un indicateur métallochrome indirect représenté par une certaine quantité de complexe auxiliaire Zn-EGTA en présence de sel monosodique de l'acide [α-(hydroxy-2 sulfo-5 phénylazo) benzylidène] hydrazino-2 benzoïque, ou zincon.

Plus récemment SHAFFER *et al.* (1967) ont mis en œuvre une technique de détection du point équivalent lors du dosage du calcium en présence de magnésium, par photométrie avec le calcon comme indicateur; WHITFIELD et LEYENDEKKERS (1969) ont utilisé dans le même but une électrode spécifique des ions Ca^{2+}.

Dans ce travail, on a étudié le dosage du calcium seul en présence du magnésium en utilisant l'EGTA avec le complexe Zn-EGTA et le zincon comme indicateur métallochrome, puis on a analysé statistiquement les résultats, en particulier l'interférence éventuelle du magnésium.

La somme calcium et magnésium a été obtenue par la méthode classique avec l'EDTA et le noir ériochrome T ou NET.

Ensuite, on a appliqué ces méthodes au dosage du calcium et du magnésium dans le vin. On a calculé, pour chacune d'elles, l'équation de la droite de régression et l'intervalle de confiance des résultats.

II. — Description des méthodes

2.1. — *Principe de la méthode de dosage du calcium en présence du magnésium avec l'EGTA en présence de complexe Zn-EGTA et de Zincon*

Calcul des constantes selon RINGBOM (1967) et de l'incertitude sur le résultat selon BUTLER (1964).

— A pH 10 obtenu avec un tampon contenant des ions NH_4^+ à une concentra-

tion qui sera précisée plus bas, les constantes conditionnelles des complexes Ca-EGTA, Mg-EGTA, Zn-EGTA, Zn-zincon, ont été calculées par RINGBOM *et al.* (1958) et SADEK *et al.* (1959) à partir de résultats expérimentaux. Les valeurs obtenues sont respectivement :

$$\log K'_{Ca'Y'} = 11{,}0; \qquad \log K'_{Mg'Y'} = 5{,}2$$
$$\log K'_{Zn'Y'} = 10{,}1; \qquad \log K'_{Zn'L'} = 6{,}5.$$

Y′ et L′ représentent respectivement EGTA et zincon; il s'agit de constantes conditionnelles selon SCHWARZENBACH (1956) et RINGBOM (1967).

K′ : constante conditionnelle; K : constante thermodynamique.

On remarque que les constantes conditionnelles notées K' des complexes du calcium et du magnésium avec EGTA sont identiques aux constantes thermodynamiques. Il n'en est pas de même pour les constantes du zinc avec EGTA et avec le zincon.

A partir de ces valeurs, on calcule selon les techniques de BUTLER (1964) et de RINGBOM (1967) une nouvelle constante conditionnelle Ca-EGTA notée $K'r$, tenant compte de la présence du magnésium à une concentration donnée, puis on obtient l'incertitude sur le résultat du dosage.

$$\log K'r_{Ca'Y'} = (\log K'_{Ca'Y'} - \log K'_{Mg'Y'}) + pMg. \qquad (1)$$

On fixe $[Mg^{2+}] = 10^{-2}$ (valeur moyenne) et on calcule alors :

$$\log K'r_{Ca'Y'} = 7{,}8; \qquad K'r_{Ca'Y'} = 6{,}31 . 10^7.$$

La constante conditionnelle résultante dépend des valeurs des constantes conditionnelles du calcium et du magnésium et varie en raison inverse de la concentration en magnésium.

— Calcul de l'incertitude sur le point équivalent donc sur le dosage.

$$\Delta y = 4{,}6 . \Delta pCa' . (K'r_{Ca'Y'})^{-\frac{1}{2}} . \left(\frac{C_0 \, . \, C}{C_0 + C}\right)^{-\frac{1}{2}} \qquad (2)$$

C_0 : concentration de l'ion métallique à doser, ici Ca^{2+}.

C : concentration de l'agent complexant, ici EGTA.

$\Delta pCa'$: différence entre les cologarithmes de la concentration de $[Ca^{2+}]'$ calculée au point équivalent et de $[Ca^{2+}]'$ calculée au point de virage de l'indicateur métallochrome.

Δy : incertitude sur y, fraction titrée du métal.

$[Ca^{2+}]'$: concentration de l'ion métallique libre, ici Ca^{2+}, plus concentration de tout le métal n'ayant pas réagi avec l'agent complexant.

— Calcul de $[Ca^{2+}]'$ au point équivalent ($y = 1$)

$$[Ca^{2+}]' = \left([CaY]' . \frac{1}{K'r_{Ca'Y'}}\right)^{\frac{1}{2}} \qquad (3)$$

$[CaY]'$: somme des concentrations de toutes les espèces contenant le chelate et l'ion métallique dans le rapport 1 : 1.

Au point équivalent, on pourra admettre que $[CaY]'$ est très sensiblement égal à la concentration du métal mise en œuvre au départ c'est-à-dire $[CaY]' = C_0$.

Pour $C_0 = 10^{-3}$ il vient :

$$[Ca^{2+}]' = \left(10^{-3} \cdot \frac{1}{6{,}31 . 10^7}\right)^{\frac{1}{2}} = 3{,}982 . 10^{-6}$$

— Calcul de $[Ca^{2+}]'$ et de $[ZnY]'$ au point de virage de l'indicateur.

$$pCa' = pZn' + (\log K'_{Ca'Y'} - \log K'_{Zn'Y'}) + \log \frac{[ZnY]'}{[CaY]'} \qquad (4)$$

pZn' : cologarithme de la concentration du métal auxiliaire, ici Zn, plus concentration de tout le métal n'ayant pas réagi avec l'agent complexant.

$[ZnY]'$: somme des concentrations de toutes les espèces contenant le chelate et l'ion métallique dans le rapport 1 : 1 au point de virage de l'indicateur; $[ZnY]'$ est fixé en fonction de $[CaY]'$.

$pZn' = \log K'_{Zn'L'} = 6{,}5$.

On voit que la valeur pCa' dépend en particulier du rapport $\frac{[ZnY]'}{[CaY]'}$.

Ces considérations théoriques permettent de déduire une loi très importante : quand la concentration en calcium à doser croît, la concentration en complexe auxiliaire $[ZnY]'$ doit être augmentée. En effet (2) montre que Δy sera d'autant plus faible que $\Delta pCa'$ sera plus petit; (3) et (4) indiquent que pCa' varie en sens inverse de $[CaY]'$ dans les deux équations, mais une étude analytique permet de voir que la variation de pCa' en fonction de $[CaY]'$ est plus grande dans (4) que dans (3). Donc pour compenser, il faut augmenter $[ZnY]'$.

Application numérique

On fixe :

Concentration du calcium à doser : 10^{-3} mole d'ion-gramme $\times$ L^{-1}.
Concentration de la solution d'EGTA : 0,05 M

$[Ca^{2+}]' = 3{,}982 . 10^{-6}$; (point équivalent) $\qquad pCa' = 5{,}4$ (point équivalent)

En utilisant (4) :

$$pCa' = 6{,}5 + (11 - 10{,}1) + \log \frac{[ZnY]'}{10^{-3}}$$

Pour que le point de virage de l'indicateur métallochrome puisse être saisi visuellement, il faut une concentration minimale en ZnY' de l'ordre de 10^{-4}M.

$$pCa' \text{ au point de virage} = 6{,}4; \quad [Ca^{2+}]' = 3{,}98 . 10^{-7}$$

$$|\Delta y| = 4{,}6 . 1{,}5 . (6{,}31 . 10^7)^{-\frac{1}{2}} . \left(\frac{5 . 10^{-5}}{0{,}051}\right)^{-\frac{1}{2}} = 0{,}027$$

On adopte $\Delta pCa' = 1{,}5$ pour tenir compte de l'erreur due à l'intervalle de virage de l'indicateur.

Donc l'incertitude maximale de titrage est de 2,7 p. 100 dans ces conditions. Le calcul statistique permettra de préciser l'intervalle de confiance.

2.2. — *Principe de la méthode de dosage de la somme calcium plus magnésium Calcul de l'incertitude théorique sur le résultat selon Butler (1964) et Ringbom (1967)*

On utilise la méthode classique de SCHWARZENBACH (1956) mettant en œuvre l'EDTA comme agent complexant et le NET comme indicateur métallochrome.

Il a paru intéressant de calculer également l'incertitude théorique sur le résultat dans des conditions opératoires usuelles.

Application numérique

$$\log K'_{MgY'} = 8{,}2 \text{ à pH } 10$$
$$K'_{MgY'} = 1{,}585 \cdot 10^{8}$$

MgY' : complexe Mg-EDTA

$$\log K_{MgL'} = 5{,}4 \text{ à pH } 10$$

MgL' : complexe Mg-NET

$$[Mg^{2+}] = 5 \cdot 10^{-3} \text{ mole d'ion} \times L^{-1}$$
$$[EDTA] = 0{,}05 \text{ M}$$

Dans ce cas, le virage se produit quand la somme calcium plus magnésium a été complexée. L'indicateur métallochrome fonctionne avec le magnésium seul puisque le calcium est complexé en premier. Donc, dans le calcul d'incertitude, il faudra faire intervenir les constantes des complexes Mg-EDTA et Mg-NET et la concentration du magnésium seul.

$$|\Delta y| = 4{,}6 \cdot 0{,}65 \cdot (1{,}585 \cdot 10^{8})^{-\frac{1}{2}} \cdot \left(\frac{25 \cdot 10^{-5}}{0{,}055}\right)^{-\frac{1}{2}}$$
$$|\Delta y| = 3{,}50 \cdot 10^{-3}$$

Donc l'incertitude théorique maximale de titrage est de 0,35 p. 100. Le calcul statistique permettra de préciser l'intervalle de confiance.

2.3. — *Interférences*

En plus de l'interférence du magnésium sur le dosage de calcium, qui a été étudiée, il y a lieu de considérer des interférences de cations lourds pratiquement négligeables dans le cas des vins, l'étude statistique le confirmera, et l'interférence des individus chimiques provenant de l'acide phosphorique. Il est évident qu'au pH des dosages les ions PO_4^{3-} donnent des précipités avec le calcium et avec le magnésium.

SCHWARZENBACH (1957) a signalé la difficulté et préconisé d'éliminer les ions PO_4^{3-}. DERDERIAN (1961), GROSMAN (1962) et LEMAIRE (1964) ont utilisé l'oxychlorure de zirconium pour éliminer les ions PO_4^{3-} par précipitation.

Nous avons, dans ce travail, éliminé les ions PO_4^{3-} sur des résines échangeuses d'anions, reprenant une technique déjà préconisée par ADAMS et ROUSE (1957).

2.4. — *Matériel et solutions utilisées*

2.41. *Matériel*

Les mesures de volume ont été effectuées au moyen de la verrerie de précision classique.

Le contrôle du pH a été réalisé avec un pH-mètre de précision Radiometer digital, pH M 52.

La calcination des échantillons de moût et de vin a mis en œuvre un four à moufle en silice à régulation électronique, Sté S.P.A.M.E.

L'échange d'ions a été réalisé dans de petites colonnes en verre, munies d'un siphon : $l = 15$ cm; diamètre : 1,5 cm. Résines utilisées : Dowex 2, $\times$ 8,50 mesh et Amberlite IRA 400, 15 mesh.

2.42. *Solutions et réactifs*

2.421. — *Dosage calcium plus magnésium*

— Acide éthylène diaminotétracétique, sel disodique 0,05 M.

— Complexe magnésium-acide éthylène diaminotétracétique, sel disodique 0,01 M.

— Noir ériochrome T : indicateur solide pulvérisé en mélange avec du chlorure de sodium dans la proportion 1 NET pour 100 NaCl.

— Solution étalon de calcium 0,0250 mole d'ion.l^{-1}, soit 1 g.l^{-1} en calcium préparée à partir de carbonate de calcium.

— Solution étalon de magnésium 0,0411 mole d'ion.l^{-1}, soit 1 g.l^{-1} en magnésium préparée à partir de $MgSO_4$, 7 H_2O.

— Tampon pH = 10 : 70 g NH_4Cl dans 570 ml NH_4OH 22° B; compléter à 1 l avec H_2O.

2.422. *Dosage du calcium seul en présence du magnésium*

— Acide éthylèneglycol, bis amino-2 oxyde d'éthyle, N, N' tétracétique, sel disodique 0,05 M : 19,017 g EGTA(forme acide), 100 ml NaOH1N; compléter à 1 l avec H_2O.

— Complexe zinc-EGTA 0,04 M : obtenu en mélangeant des volumes égaux de sulfate de zinc 0,2 M et d'EGTA 0,2 M en tamponnant à pH 10, en vérifiant le point équivalent en présence de zincon et en diluant convenablement.

— Tampon pH = 10 : 25 g $Na_2B_4O_7$, 10 H_2O, 3,5 g NH_4Cl, 5,7 g NaOH, compléter à 1 l avec H_2O.

— Zincon : 0,065 g de zincon, 2 ml Na OH 0,1 N, compléter à 100 ml avec H_2O.

2.5. — *Techniques expérimentales*

2.51. *Dosage du calcium et du magnésium en solutions aqueuses et étalonnage des solutions d'agent complexant*

2.511. *Dosage du magnésium avec l'acide éthylène diaminotétracétique en présence de noir ériochrome T*

On opère sur 20 ml de solution contenant le magnésium à doser, auxquels on ajoute 5 ml de solution tampon à pH 10, puis on complète à 100 ml avec de

l'eau distillée; on ajoute une pincée (0,2 g) de noir ériochrome T; on obtient un pH de 9,85.

Le terme de la réaction est marqué par le virage de l'indicateur métallochrome du rouge au bleu.

2.512. *Dosage du calcium avec l'acide éthylène diaminotétracétique, avec le complexe auxiliaire Mg-EDTA en présence de noir ériochrome T*

On opère sur 20 ml de solution contenant le calcium à doser, auxquels on ajoute 5 ml de solution tampon à pH 10; on ajuste éventuellement préalablement à pH $\simeq$ 10 avec de l'hydroxyde de sodium; on verse 5 ml de complexe auxiliaire Mg-EDTA, on complète à 100 ml avec H_2O et on ajoute une pincée de noir ériochrome T. La concentration du complexe auxiliaire est donc $5 . 10^{-4}$ M. Le terme de la réaction est marqué par le virage de l'indicateur métallochrome du rouge au bleu (le virage doit être net du rouge au bleu franc).

2.513. *Dosage du calcium et du magnésium avec l'acide éthylène diaminotétracétique en présence de noir ériochrome T* (*cf.* *2.511. avec ajustage à pH 10 éventuellement*)

2.514. *Dosage du calcium avec l'EGTA, avec le complexe auxiliaire zinc-EGTA, en présence de zincon*

On opère sur 20 ml de solution contenant le calcium à doser; on ajuste à pH 10 avec le volume suffisant d'hydroxyde de sodium N et 20 ml de tampon puis on ajoute 0,5 ml du complexe auxiliaire Zn-EGTA et 1 ml de zincon fraîchement préparé; on complète à 100 ml avec H_2O.

La concentration du complexe auxiliaire est donc $2 . 10^{-4}$ M.

Le terme de la réaction est marqué par le virage de l'indicateur métallochrome du bleu au rose.

2.52. *Dosage du calcium et du magnésium dans les moûts et les vins*

Les dosages précédents appliqués aux moûts et aux vins impliquent une minéralisation préalable. Étant donné qu'on doit dans tous les cas opérer à pH 10, la minéralisation par voie humide est impraticable. On a donc minéralisé par voie sèche à 550 °C.

Les cendres de la prise d'essai sont reprises par 2 ml d'HCl, le pH est ajusté à 10 et le volume total est porté à 100 ml. Ensuite, les dosages sont effectués suivant les techniques exposées ci-dessus.

On a évidemment, à pH 10, un précipité de phosphates divers. Cette interférence a été étudiée en effectuant les dosages d'une part sur la solution des cendres brutes, d'autre part sur la solution des cendres débarrassée des ions PO_4^{3-} par échange d'ions sur des résines anioniques Dowex 2, X 8, 50-100 mesh, forme Cl^- et Amberlite IRA 400, 16-50 mesh, forme Cl^-.

Il est à noter qu'on ne peut éliminer totalement les ions PO_4^{3-} en un seul passage sur la colonne, quelle que soit la résine mise en œuvre. En effet, pour éviter tout précipité de phosphate dans la solution des cendres, le pH ne doit pas dépasser la valeur 2,2. Or, dans ces conditions, l'acide phosphorique est sensiblement pour 40 p. 100 sous forme H_3PO_4 et pour 60 p. 100 sous forme $H_2PO_4^-$ et les coefficients d'échange de ces individus chimiques avec l'ion Cl^- de la résine sont

faibles. Donc le rendement de l'échange d'ions est faible et comme on ne peut consentir à l'utilisation de colonnes longues ou, ce qui revient au même, à des passages répétés sur la résine, sous peine d'obtenir des dilutions et des temps de passage incompatibles avec la pratique, on obtient une solution des cendres débarrassée incomplètement des ions PO_4^{3-} et, en amenant à pH 10 pour le dosage, il subsiste un léger précipité de phosphate. La fin des réactions est décelée nettement, quand d'une part l'EGTA a complexé le calcium libre et le calcium sous forme de phosphate, et quand d'autre part l'EDTA a complexé le calcium et le magnésium libres et sous forme de phosphates.

Le dosage du calcium est effectué avec l'EGTA sur une première prise d'essai de vin. Puis sur une seconde prise d'essai on dose avec l'EDTA la somme calcium plus magnésium. Par différence, on obtient la teneur en magnésium. Pour effectuer le calcul de la teneur en magnésium, il faut déduire du volume total d'EDTA correspondant à la somme calcium plus magnésium le volume d'EDTA correspondant au calcium.

Remarque: Les ions de l'acide phosphorique sont éliminés par échange d'ions à pH 2,2, puis on ajuste à pH 10, et le volume total est porté à 100 ml.

III. — Résultats et interprétation statistique

3.1. — *Étalonnage des réactifs et étude des interférences*

3.11. *Étalonnage de la solution d'EDTA 0,05 M, par rapport à une solution de référence à 1 g.L^{-1} en magnésium, à 20 °C* (*tabl. 1*)

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = 0{,}001643$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0{,}001643}{\sqrt{6}} = 0{,}00067$$

$\bar{x} = 1{,}1885$

t de Student à 5 p. 100 et 5 ddl = 2,571

TABLEAU I

Étalonnage de la solution d'EDTA 0,05 M, par rapport à une solution de référence à 1 g.l^{-1} en magnésium, à 20 °C.

Masse de magnésium en mg dans la prise d'essai	Volume EDTA 0,05 M versé en ml	1 ml EDTA 0,05 M correspond à : — en mgMg
20	16,80	1,190
20	16,80	1,190
20	16,80	1,190
20	16,85	1,187
20	16,85	1,187
20	16,85	1,187

D'où, à 95 p. 100, l'intervalle de confiance est 1,1885 ± $s_{\bar{x}}$.2,571, soit :

$$1{,}1885 \pm 0{,}0017$$

On a donc une très bonne précision; mais la valeur théorique, correspondant à une réaction stoechiométrique, soit 1,216, est hors de l'intervalle de confiance. Il y a donc une erreur systématique (défaut d'exactitude), qui peut être dûe à un manque de pureté du réactif ou à une température trop basse.

3.12. *Étalonnage de la solution d'EDTA 0.05 M, par rapport à une solution de référence à 1 g.l⁻¹ en magnésium, à 60 °C (tabl. 2)*

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = 0{,}00258$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = 0{,}0010$$

$$\bar{x} = 1{,}189$$

t de Student à 5 p. 100 et 5 ddl = 2,571.

D'où, à 95 p. 100, l'intervalle de confiance est 1,189 ± $s_{\bar{x}}$. 2,571, soit :

$$1{,}189 \pm 0{,}0027$$

Donc, très bonne précision, mais la valeur théorique est hors de l'intervalle de confiance; il y a donc encore une erreur systématique.

TABLEAU 2

Étalonnage de la solution d'EDTA 0,05 M, par rapport à une solution de référence à 1 g.l^{-1} en magnésium, à 60 °C

Masse de magnésium en mg dans la prise d'essai	Volume EDTA 0,05 M versé en ml	1 ml EDTA 0,05 M correspond à : — en mgMg
20	16,85	1,187
20	16,80	1,190
20	16,80	1,190
20	16,80	1,190
20	16,85	1,187
20	16,75	1,194

3.13. *Étude de l'influence de la température : comparaison des deux séries de mesures, obtenues respectivement à 20 °C et 60 °C, par analyse de la variance (tabl. 3, tabl. 4)*

Donc la différence des moyennes n'est pas significative.

TABLEAU 3

Résultats-comparatifs de l'étalonnage de la solution d'EDTA 0,05 M à 20 °C et 60 °C

1 ml EDTA 0,05 M correspond à : — en mg Mg à 20 °C		1 ml EDTA 0,05 M correspond à : — en mg Mg à 60 °C	
	1,190		1,187
	1,190		1,190
	1,190		1,190
	1,187		1,190
	1,187		1,187
	1,187		1,194
$\bar{x}_a$:	1,1885	$\bar{x}_b$:	1,1896

TABLEAU 4

Étude de l'influence de la température sur l'étalonnage d'EDTA 0,05 M par rapport au magnésium, par analyse de la variance

	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté	Variance	F calculé
Traitements . . .	0,0000041	1	0,0000041	0,876
Erreur	0,0000468	10	0,00000468	
Variation totale. .	0,0000509	11		

3.14. *Étalonnage de la solution d'EDTA 0,01 M, par rapport à une solution de référence à 0,1 g.l^{-1}, en magnésium, à 20 °C (tabl. 5)*

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = 0{,}00004082$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = 0{,}000167$$

$$\bar{x} = 0{,}241$$

t de Student à 5 p. 100 et 5 ddl = 2,571

D'où, à 95 p. 100, l'intervalle de confiance est 0,2410 ± $s_{\bar{x}}$.2,571, soit :

0,2410 ± 0,00004

Donc, on a une excellente précision, mais la valeur théorique : 0,243, est hors de l'intervalle de confiance. On peut expliquer cette erreur systématique par un défaut de pureté de l'EDTA ou du sulfate de magnésium (tolérance minimale de pureté : 98 p. 100).

On adopte alors comme valeur moyenne d'étalonnage :

1 ml EDTA 0,05 M correspond à 1,195 mg de magnésium.

TABLEAU 5

Étalonnage de la solution d'EDTA 0,01 M, par rapport à une solution de référence à 0.1 g.l⁻¹ en magnésium, à 20 °C

Masse de magnésium en mg dans la prise d'essai	Volume EDTA 0,01 M versé en ml	1 ml EDTA 0,01 M correspond à : — en mg Mg
2	8,30	0,241
2	8,25	0,242
2	8,30	0,241
2	8,30	0,241
2	8,30	0,241
2	8,30	0,241

3.15. *Étalonnage de la solution d'EDTA 0,05 M, par rapport à une solution de référence à 1 g.l^{-1} en calcium, à 20 °C* (*tabl. 6*)

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n - 1}} = 0{,}00258$$

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0{,}00258}{\sqrt{6}} = 0{,}0010$$

$$\bar{x} = 2{,}0033$$

t de Student à 5 p. 100 et 5 ddl = 2,571.

D'où, à 95 p. 100, l'intervalle de confiance est 2,0033 ± $s_{\bar{x}}$.2,571 soit :

$$2{,}0033 \pm 0{,}0027.$$

Donc, très bonne précision et très bonne exactitude car la valeur théorique correspondant à une réaction stoechiométrique, soit 2,004, se trouve dans l'intervalle de confiance.

TABLEAU 6

Étalonnage de la solution d'EDTA 0,05 M, par rapport à une solution de référence à 1 g.l⁻¹ en calcium, à 20 °C

Masse de calcium en mg dans la prise d'essai	Volume EDTA 0,05 M versé en ml	1 ml EDTA 0,05 M correspond à : — en mg Ca
20	10	2,00
20	10	2,00
20	9,975	2,005
20	9,975	2,005
20	9,975	2,005
20	9,975	2,005

3.16. *Étalonnage de la solution d'EDTA 0,05 M, par rapport à une solution de référence à 1 g.l⁻¹ en calcium, à 60 °C (tabl. 7)*

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \overline{x})^2}{n - 1}} = 0{,}01032$$

$$s_{\overline{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0{,}01032}{\sqrt{6}} = 0{,}0042$$

$$\overline{x} = 2{,}053$$

t de Student à 5 p. 100 et 5 ddl = 2,571.

D'où, à 95 p. 100, l'intervalle de confiance est 2,053 ± $s_{\overline{x}}$.2,571, soit :

$$2{,}053 \pm 0{,}0108$$

Donc, bonne précision, mais la valeur théorique, 2,004, est hors de l'intervalle de confiance. Il semble bien que la température élevée soit responsable du défaut d'exactitude.

TABLEAU 7

Étalonnage de la solution d'EDTA 0,05 M, par rapport à une solution de référence à 1 g.l⁻¹ en calcium, à 60 °C

Masse de calcium en mg dans la prise d'essai	Volume EDTA 0,05 M versé en ml	1 ml EDTA 0,05 M correspond à : — en mg Ca
20	9,80	2,04
20	9,70	2,06
20	9,80	2,04
20	9,70	2,06
20	9,70	2,06
20	9,70	2,06

3.17. *Étalonnage de la solution d'EDTA 0,01 M, par rapport à une solution de référence à 0,1 g.l⁻¹ en calcium, à 20 °C (tabl. 8)*

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \overline{x})^2}{n - 1}} = 0{,}00433449$$

$$s_{\overline{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0{,}00433449}{\sqrt{12}} = 0{,}00125$$

$$\overline{x} = 0{,}4063$$

t de Student à 5 p. 100 et 11 ddl = 2,201.

D'où, à 95 p. 100, l'intervalle de confiance est 0,4063 ± $s_{\overline{x}}$.2,201, soit :

$$0{,}4063 \pm 0{,}0027.$$

TABLEAU 8

Étalonnage de la solution d'EDTA 0,01 M, par rapport à une solution de référence à 0,1 g.l⁻¹ en calcium, à 20 °C

Masse de calcium en mg dans la prise d'essai	Volume EDTA 0,01 M versé en ml	1 ml EDTA 0,01 M correspond à : — en mg Ca
2	4,90	0,408
2	4,85	0,412
2	4,85	0,412
2	4,90	0,408
2	4,85	0,412
2	4,90	0,408
2	5,00	0,400
2	4,95	0,404
2	4,95	0,404
2	4,95	0,404
2	5,00	0,400
2	4,95	0,404

Donc très bonne précision, mais la valeur théorique, 0,4008, est hors de l'intervalle de confiance. On a une erreur systématique par excès.

On adopte alors comme valeur moyenne d'étalonnage :

— 1 ml EDTA 0,05 M correspond à 2,00 mg de calcium.

3.18. *Étalonnage de la solution d'EGTA 0,05 M, par rapport à une solution de référence à 1 g.l⁻¹ en calcium, à 20 °C (tabl. 9)*

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - x)^2}{n - 1}} = 0{,}0063245$$

$$s_x = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0{,}0063245}{\sqrt{6}} = 0{,}0025$$

$$\bar{x} = 2{,}00$$

t de Student à 5 p. 100 et 5 ddl = 2,571.

TABLEAU 9

Étalonnage de la solution d'EGTA 0,05 M, par rapport à une solution de référence à 1 g.l⁻¹ en calcium, à 20 °C

Masse de calcium en mg dans la prise d'essai	Volume EGTA 0,05 M versé en ml	1 ml EGTA 0,05 M correspond à : — en mg Ca
20	10,00	2,00
20	10,00	2,00
20	10,05	1,99
20	10,00	2,00
20	9,95	1,99
20	10,00	2,00

D'où, à 95 p. 100, l'intervalle de confiance est 2,00 ± $s_{\bar{x}}$.2,571, soit :

2,000 ± 0,006.

Donc, on a une excellente précision et une très bonne exactitude puisque la valeur théorique, 2,004, est comprise dans l'intervalle de confiance.

On adopte alors comme valeur moyenne d'étalonnage :

— 1 ml d'EGTA 0,05 M correspond à 2,00 mg de calcium.

3.19. *Étude statistique par analyse de la variance de l'interférence du magnésium sur le dosage du calcium avec l'EGTA* (tabl. 10 et 11)

L'analyse de la variance a été effectuée sur les résultats exprimés en mg de calcium par ml d'EGTA 0,05 M. Toutes les séries comprenaient 6 prises d'essai. Toutes les prises d'essai contenaient une masse identique de calcium, soit 20 mg. Les différentes séries différaient entre elles par la teneur en magnésium qui variait de 0 à 50 mg. Le dosage était effectué avec EGTA 0,05 M (tabl. 10).

TABLEAU 10

Interférence du magnésium sur le dosage du calcium avec EGTA. Masse de calcium constante dans toutes les prises d'essai : 20 mg. Masse de magnésium croissante dans les séries de 0 à 50 mg

	Série 1 Témoin Magnésium 0 mg	Série 2 Magnésium 10 mg	Série 3 Magnésium 20 mg	Série 4 Magnésium 30 mg	Série 5 Magnésium 40 mg	Série 6 Magnésium 50 mg
	2,00	1,99	1,98	2,00	2,02	1,98
	2,00	2,01	2,02	2,02	2,02	1,98
	1,99	1,99	2,02	2,00	2,01	1,98
	2,00	2,01	2,01	2,02	2,01	1,98
	2,01	2,00	2,03	2,02	2,01	1,98
	2,00	2,00	2,02	2,02	2,02	1,98
Total. .	12,00	12,00	12,08	12,08	12,09	11,88
Σx_i^2 . .	24,0002	24,0004	24,3226	24,3216	24,3615	23,5224
$\bar{x}$. . .	2,00	2,00	2,01333	2,01333	2,015	1,98

Donc, l'interférence du magnésium est très hautement significative. On a alors effectué le test de DUNNETT pour déterminer les moyennes significativement différentes de la moyenne du témoin.

Pour cela, on calcule la plus petite amplitude significative : p.p.a.s.

$$\text{p.p.a.s.} = d_{1-\alpha/2} \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot \text{CMe}}{r}} = 2{,}66 \cdot \sqrt{\frac{2 \cdot 9{,}388 \cdot 10^{-5}}{6}} = 0{,}015$$

CM*e* (carré moyen de l'erreur) = $9{,}388 \cdot 10^{-5}$

r (nombre de répétitions) = 6

TABLEAU II

Analyse statistique de l'interférence du magnésium sur le dosage de calcium

	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté	Variance	F calculé	F théorique (0,001)
Traitements	0,00541388	5	0,0010827	11,53	5,53
Erreur	0,002816	30	0,00009388		
Variation totale . . .	0,0082305	35			

$d_{1-\alpha/2} = 2{,}66$ pour : $\alpha = 0{,}05$.
p (nombre de populations à comparer au témoin) = 5
et ddl (erreur) = 30.

On constate que tant que la concentration en magnésium n'atteint pas le double de la concentration en calcium la différence entre les moyennes n'est pas significative. Au-delà de ce seuil, l'interférence existe. Le calcul a été fait au risque 5 p. 100.

Mais on voit également que même au-delà du seuil critique l'erreur est de 0,5 p. 100, donc très faible.

3.2. — *Dosage du calcium dans un vin avec l'EGTA après élimination des ions PO_4^{3-}*

Pour vérifier l'exactitude et la précision de l'analyse, on a utilisé la méthode des ajouts dosés et la méthode des prises multiples.

On a pu ainsi étudier les erreurs systématiques et calculer l'équation de la droite de régression ainsi que l'intervalle de confiance d'un résultat quelconque.

TABLEAU 12

Dosage du calcium dans un vin, avec EGTA, par la méthode des incréments

Calcium en mg . l^{-1} déterminé avec EDTA 0,05 M				
Témoin	+ 20 mg.l^{-1} de calcium	+ 40 mg.l^{-1} de calcium	+ 60 mg.l^{-1} de calcium	+ 100 mg.l^{-1} de calcium
91,2	110,8	126,4	150,0	182,0
91,6	109,6	124,0	152,0	184,0
86,0	109,2	126,4	156,0	184,0
94,0	110,0	126,0	140,0	184,0
85,60	104,8	127,2	144,0	187,00
90,10	109,2	126,0	140,0	189,0

Précisons immédiatement que la méthode des prises multiples a montré qu'il n'existait pas d'erreur systématique constante.

Le témoin est un vin de Bordeaux du commerce. Il a été enrichi en calcium de façon à obtenir les augmentations progressive suivantes exprimées en mg de calcium par litre : + 20; + 40; + 60; + 100 (tabl. 12).

3.21. *Droite de régression*

L'équation de la droite de régression a été calculée par la méthode des moindres carrés. On obtient :

$$y' = 0{,}9592\,x + 88{,}975$$

On en déduit immédiatement la valeur x_0 correspondant à la teneur en calcium du témoin

$$|x_0| = \frac{88{,}975}{0{,}9592} = 92{,}76$$

Rappelons que l'équation de la droite résultant de l'utilisation de la méthode des ajouts dosés est :

$$y = k(x_0 + x).$$

x_0 : concentration inconnue du témoin.
x : concentration variable connue résultant de l'ajout dosé.

On voit que pour

$$y = 0, \quad x_0 = -x.$$

3.22. *Analyse de la variance* (*tabl. 13*)

Les v'_i représentent les valeurs obtenues avec l'équation de la droite de régression. Donc la régression est très hautement significative.

TABLEAU 13

Test de validité de la régression sur la droite d'étalonnage du dosage du calcium dans un vin par analyse de la variance

	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté	Variance	F calculé	F théorique (0,001)
Due à la régression	$\Sigma(y'_i - \bar{y})^2 = 0{,}9592) \times \Sigma(x_i - \bar{x})^2 = 19322{,}892$	1	$s^2_1 = 19322{,}892$	1427,09	14,38
Résiduelle . . .	$\Sigma(y_i - y'_i)^2 = 297{,}881$	22	$s^2_2 = 13{,}540$		
Variation totale	$\Sigma(y_i - \bar{y})^2 = 19620{,}773$	23			

3.23. *Calcul de l'intervalle de confiance du résultat d'analyse*

La droite de régression étant calculée, il s'agit de déterminer, autour d'une valeur quelconque x, c'est-à-dire autour d'une concentration quelconque C_x, un intervalle qui ait la probabilité $(1 - \alpha)$ de contenir la valeur vraie de x ou de C_x.

Si on considère un échantillon quelconque de concentration en calcium C_x, la variance du facteur analytique correspondant y se décompose en deux facteurs : la variance $s_2{}^2$ due aux fluctuations résiduelles autour de la droite de régression et la variance due à la régression $(y' = f(x))$, c'est-à-dire due à l'imprécision sur la détermination de cette droite.

Soit y'_0 le point de la droite d'abscisse x_0; on a :

$$y'_0 = 0{,}9592\, x_0 + 88{,}975$$

et on sait que cette équation peut s'écrire en fonction de $\bar{y}$ et $\bar{x}$ sous la forme équivalente :

$$y'_0 = \bar{y} + 0{,}9592\,(x_0 - \bar{x}) \Leftrightarrow y'_0 = \bar{y} + a(x_0 - \bar{x})$$

en posant

$$0{,}9592 = a$$

En considérant la population des y obtenus à partir de séries différentes de mesures, c'est-à-dire à partir de droites des moindres carrés différentes, la variance de y'_0 est :

$$\sigma^2_{y'_0} = \sigma^2_{\bar{y}} + (x_0 - \bar{x})^2 . \sigma^2_a.$$

La variance $\sigma^2_{\bar{y}}$ est estimée par $\frac{s^2_2}{n}$ et la variance $\sigma_a{}^2$ par

$$\frac{s^2_2}{\sum\limits_{i=1}^{i=n} (x_i - \bar{x})^2}$$

d'où :

$$s^2_{y'_0} = s^2_2 . \left[\frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}\right]$$

et

$$s^2_{y_0} = s^2_2 + s^2_{y'_0} = s^2_2 . \left[1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}\right]$$

Pour la valeur x_0 donnée, on peut alors définir un intervalle de confiance, autour de y'_0, qui a la probabilité $1 - \alpha$ de contenir la valeur expérimentale vraie y_0 soit :

$$y'_0 \pm s_{y_0} . t_{1-\alpha/2}$$

$t_{1-\alpha/2}$ est la valeur de la variable de Student à $(n - 2)$ degrés de liberté telle que :

$$\text{Prob}\,(|t| > t_{1-\alpha/2}) = \alpha$$

De la valeur de l'intervalle de confiance autour de y'_0 on peut facilement déduire l'intervalle de confiance autour d'un résultat d'analyse x_0 :

$$x_0 \pm \frac{1}{a} s_{y_0} \cdot t_{1-\alpha/2}.$$

Pour n_0 mesures sur un vin à analyser l'intervalle de confiance devient :

$$x_0 \pm \frac{1}{a} s_{y_0} \cdot t_{1-\alpha/2} \qquad \text{avec} \qquad s^2_{y_0} = s^2_2 \cdot \left[\frac{1}{n_0} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}\right]$$

Application numérique :

$n_0 = 6$
$s^2_{y_0} = 16{,}897$; $s_{y_0} = 4{,}110$
t de Student à 5 p. 100 et 22 degrés de liberté = 2,074.
D'où le résultat obtenu à partir de la droite de régression :

$$92 \pm \frac{1}{0{,}9592} \cdot 4{,}11 \cdot 2{,}074 = 92 \pm 8{,}8 . l^{-1} \text{ mg de calcium.}$$

Le dosage du calcium dans le vin, moyenne de 6 mesures, donne : 89,7 mg.
Donc, il n'y a pas d'erreur systématique proportionnelle à la concentration et, à 95 p. 100, l'intervalle de confiance est 92 ± 8,8 . l^{-1} en mg de calcium.

Remarque : Il faut noter qu'au voisinage de la valeur moyenne $\bar{x}$ = 55 mg l'intervalle de confiance est moins étendu et on calcule pour l'application numérique :

$$55 \pm 3{,}6 \text{ mg} . l^{-1} \text{ de calcium.}$$

3.3. — *Dosage du magnésium dans un vin avec l'EDTA après élimination des ions PO_4^{3-}*

On a opéré sur le même vin, dont la teneur en calcium a été déterminée avec EGTA.

Pour vérifier l'exactitude et la précision de l'analyse on a utilisé la méthode des ajouts dosés de magnésium et la méthode des prises multiples.

On a également étudié l'interférence du calcium sur le dosage du magnésium.

3.31. *Étude du dosage du magnésium*

La teneur en calcium déterminée au moyen de la droite de régression est 92,7 mg . l^{-1} qui correspond à un volume constant d'EDTA 0,05 M de : $\frac{92{,}7}{20 \times 2} = 2{,}317$ ml pour 50 ml de prise d'essai de vin. Donc les volumes d'EDTA 0,05 M seront systématiquement corrigés, en moins, de cette valeur pour obtenir le volume d'EDTA 0,05 M correspondant au magnésium seul.

La méthode des prises multiples a montré qu'il n'existait pas d'erreur systématique constante.

Le vin témoin a été enrichi en magnésium de façon à obtenir des augmentations progressives exprimées en mg de magnésium par litre : + 20; + 60; + 100 (tabl. 14).

TABLEAU 14

Dosage du magnésium dans un vin, avec EGTA et EDTA, par la méthode des incréments

Magnésium en $mg.l^{-1}$ déterminé avec EDTA 0,05 M			
Témoin	+ 20 $mg.l^{-1}$ de magnésium	+ 60 $mg.l^{-1}$ de magnésium	+ 100 $mg.l^{-1}$ de magnésium
116,70	131,043	171,673	209,913
114,31	128,653	175,258	211,108
107,14	132,238	165,698	211,108
117,90	129,848	165,698	209,913
115,50	126,263	165,698	209,913
114,31	129,848	171,673	209,913

3.311. *Droite de régression*

$$y' = 1{,}00828\,x + 109{,}25$$

$$|x_0| = \frac{109{,}25}{1{,}00828} = 108{,}35$$

3.312. *Analyse de la variance* (*tabl. 15*)

Donc le test de validité de la régression est très hautement significatif.

TABLEAU 15

Test de validité de la régression sur la droite d'étalonnage du dosage du magnésium dans un vin par analyse de la variance

	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté	Variance	F calculé	F théorique (0,001)
Due à la régression	$\Sigma(y'_i - \bar{y})^2 = (1{,}00828)^2 \times \Sigma(x_i - \bar{x})^2 = 19519{,}3167$	1	$s^2_1 = 19519{,}3167$	2820,9	16,12
Résiduelle . . .	$\Sigma(y_i - y'_i)^2 = 110{,}7116$	16	$s^2_2 = 6{,}919475$		
Variation totale	$\Sigma(y_i - \bar{y})^2 = 19630{,}0283$	17			

3.313. *Calcul de l'intervalle de confiance du résultat d'analyse*

On utilise évidemment la même technique de calcul qu'en 3.2.3.

Application numérique :

$n_0 = 6$
$s^2_{y_0} = 11{,}752145$; $s_{y_0} = 3{,}428140$
t de Student à 5 p. 100 et 16 degrés de liberté $= 2{,}12$.

D'où le résultat obtenu à partir de la droite de régression :

$$108 \pm \frac{1}{1{,}008} \cdot 3{,}428 \cdot 2{,}12 = 108 \pm 7{,}2 \text{ en mg.} l^{-1} \text{ de magnésium.}$$

Le dosage du magnésium dans le vin, moyenne de 6 mesures, donne : 114,3 mg.l^{-1} de magnésium.

Donc on peut dire qu'il n'y a pas d'erreur systématique proportionnelle à la concentration, puisque la droite de régression est pratiquement confondue avec la première bissectrice et, à 95 p. 100, l'intervalle de confiance est :

$$108 \pm 7{,}2 \text{ en mg.} l^{-1} \text{ de magnésium.}$$

3.32. *Étude de l'interférence du calcium*

Le même vin a été enrichi en calcium de façon à obtenir les augmentations progressives suivantes exprimées en mg de calcium par litre : + 20; + 40; + 60; + 100.

TABLEAU 16

Interférence du calcium sur le dosage du magnésium dans un vin avec EGTA et EDTA. Masse de magnésium constante dans toutes les prises d'essai. Masse de calcium croissante dans les séries de 0 mg.l^{-1} à 100 mg.l^{-1}.

Magnésium en mg.l^{-1} déterminé avec EDTA 0,05 M				
Témoin	+ 20 mg.l^{-1} de calcium	+ 40 mg.l^{-1} de calcium	+ 60 mg.l^{-1} de calcium	+ 100 mg.l^{-1} de calcium
116,70	116,70	116,70	115,50	117,90
114,31	113,71	115,50	117,90	120,29
107,14	115,50	113,12	114,31	115,50
117,90	115,63	119,09	113,12	119,09
115,50	111,32	113,12	115,50	115,50
114,31	114,91	114,31	116,70	120,29

TABLEAU 17

Analyse statistique de l'interférence du calcium sur le dosage du magnésium dans un vin avec EGTA et EDTA

	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté	Variance	F calculé	F théorique (0,05)
Traitements . .	53,5000	4	13,375	2,167	2,76
Erreur	154,2646	25	6,1705		
Variation totale	207,7646	29			

La teneur en magnésium était donc constante et on connaissait la teneur en calcium.

On a dosé avec l'EDTA dans chaque prise d'essai la somme calcium plus magnésium et on a corrigé le volume total d'EDTA en retranchant la valeur correspondant, dans chaque cas, au calcium, de façon à obtenir le volume d'EDTA 0,05 M correspondant au magnésium seul. On a ensuite effectué une analyse de la variance correspondant à l'interférence du calcium (tabl. 16, tabl. 17).

Donc, au risque 5 p. 100, l'interférence du calcium n'est pas significative.

IV. — Conclusions

Ce travail a permis de préciser ou de mettre en évidence les résultats suivants :

4.1. — Le dosage du magnésium avec l'EDTA donne des résultats identiques à 20 °C, c'est-à-dire à la température ordinaire, et à 60 °C, température habituellement préconisée. Donc, il ne semble pas qu'il soit nécessaire de chauffer.

4.2. — Le dosage du calcium seul avec l'EGTA est réalisé avec une très bonne précision et une très bonne exactitude; le dosage du calcium en présence du magnésium avec l'EGTA présente très sensiblement les mêmes qualités.

4.3. — On a montré la possibilité d'appliquer ces méthodes au vin pour doser, d'une part avec l'EGTA, directement le calcium en présence du magnésium, sans élimination de celui-ci, d'autre part, avec l'EDTA, la somme calcium plus magnésium, puis de déduire par différence la teneur en magnésium.

L'analyse statistique met en évidence une précision et une exactitude satisfaisantes et par conséquent une amélioration sensible par rapport à la complexométrie avec le seul EDTA.

Le champ d'application de ces méthodes peut être étendu aux moûts de raisin et à d'autres liquides alimentaires tels que la bière, ainsi qu'aux solutions du sol.

4.4. — On a constaté la nécessité absolue d'éliminer les ions PO_4^{3-}, qui interfèrent très nettement. D'autre part, on a opéré sur les cendres du vin, ce qui implique une minéralisation, opération toujours longue, mais qui autorise les dosages en séries.

Reçu pour publication en décembre 1976.

Remerciements

Nous adressons les plus vifs remerciements à M. Ph. DECOMBE, Professeur de Mathématiques appliquées à l'E.N.I.T.A. de Bordeaux, pour les conseils donnés et les moyens de calcul fournis en vue de l'étude statistique.

Summary

Complexometric titration of calcium and magnesium by the joint action of two chelating agents and its application to wine

The complexometric titration of calcium alone and of calcium in presence of magnesium is studied in theory and carried out with a chelating agent, the ethyleneglycol bis- (2-amino-ethylether) N, N′ tetraacetic acid (EGTA). It is proved that in the case of the titration of calcium in presence of magnesium, the removing of the latter is not necessary.

The complexometric titration of calcium and magnesium implies the use of the EGTA and of a second chelating agent, the disodium salt of the ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA).

These methods are applied to the determination of calcium and magnesium content in wine. All the results are submitted to a statistical analysis.

The precision and accuracy of the results proved to be very good in simple solution and statisfactory in wine.

The improvement as compared with the conventional method with EDTA is very considerable.

Resumen

Dosificación complexométrica del calcio y del magnesio por utilización combinada de dos agentes complejantes Aplicación al vino

La dosificación complexométrica del calcio solo, así como del calcio en presencia de magnesio, es estudiada teóricamente y llevada a la práctica mediante utilización de un agente complejante : el ácido etilenoglicol, bis amino - 2 óxido de etilo, N, N′ tetracético (EGTA). Se demuestra que, en el caso de la determinación del calcio en presencia de magnesio, no es necesaria la eliminación de este último.

La dosificación complexométrica del calcio y del magnesio precisa la puesta en aplicación del EGTA y de un segundo agente complejante, que es la sal disódica del ácido etilenodiaminotetracético (EDTA).

Estos métodos son aplicados para la dosificación del calcio y del magnesio en el vino. Todos los resultados son objeto de un análisis estadístico.

Se comprueba una muy correcta precisión y, asimismo, una muy correcta exactitud de los resultados en las soluciones simples y, del mismo modo, una precisión y exactitud satisfactorias en el vino.

La mejora obtenida es muy apreciable en relación con el método convencional con el EDTA.

Riassunto

Dosaggio complessometrico del calcio et del magnesio mediante impiego congiunto di due agenti complessanti
Applicazione del vino

Il dosaggio complessometrico del calcio solo e del calcio in presenza del magnesio studiato teoricamente ed ottenuto impiegando un agente complessante, l'acido etilenglicole, bis ammino-2 ossido d'etile, N, N′ tetracetico (EGTA). Viene dimostrato che nel caso della determinazione del calcio in presenza di magnesio, non è necessario eliminare quest'ultimo.

Il dosaggio complessometrico del calcio e del magnesio fa ricorso all'EGTA e a un secondo agente complessante che è il sale disodico dell'acido etilenediamminotetracetico (EDTA).

Questi metodi sono applicati al dosaggio del calcio e del magnesio nel vino. Tutti i risultati sono analizzati statisticamente.

Per quanto riguarda le soluzioni semplici, i risultati appaiono molto precisi e molto esatti; nel caso del vino, la precisione e l'esattezza dei risultati è soddisfacente. Rispetto al metodo classico che utilizzava l'EDTA, il progresso è molto sensibile.

Références bibliographiques

Adams F., Rouse R. D., 1957. Use of an anion exchange resine to eliminate anion interference in calcium determination by flame photometry. *Soil. Sci.*, **83**, 305-312.

Bjerrum J., Schwarzenbach G., Sillen L. G., 1958. Stability constants. *Chem. Soc.* (London), Spec. Publ., 7.

Butler J. N., 1964. *Ionic equilibrium. A mathematical approach.* 547 p. Addison- Wesley publishing company, inc., Reading, Massachusetts.

CLOSE R. A., WEST T. S., 1960. A new selective metallochromic reagent for the detection and chelatometric determination of calcium. *Talanta*, G. B., (5), 221-230.

Commissariat à l'énergie atomique, 1969. *Méthodes statistiques en chimie analytique*. Dunod. Paris.

DERDERIAN M. D., 1961. Determination of calcium and magnesium in plant material with EDTA. *Anal. Chem.*, **33**, 1796-1798.

DITZ J., NEUMANN J., SUK V., 1970. Vergleich verschiedener Indicatoren zur chelato metrischen Calciumbestimmung in Gegenwart von Magnesium. *Z. Fresenius anal. Chem.*, D.D.R., **251** (5). 298-299.

FLASCHKA H., 1959. *EDTA titrations. An introduction to theory and pratice*. Pergamon Press.

GROSMAN R., 1962. Élimination de l'acide phosphorique pour le dosage complexométrique du calcium des plantes. *Ann. agron.*, **13** (3), 255-260.

LACROIX Y., 1973. *Analyse chimique. Interprétation des résultats par le calcul statistique*. Masson et Cie, Éditeurs, Paris.

LEMAIRE F., 1964. Remarque sur le dosage complexométrique du calcium et du magnésium dans les extraits végétaux avec précipitation préalable des phosphates par l'oxychlorure de zirconium. *Ann. agron.*, **15** (5), 583-589.

LOTT P. F., CHENG K. L., 1959. Improved end point by addition of polyvinyl alcohol in the EDTA titration of calcium with calcon as indicator. *Chemist-Analyst*, U.S.A., **48** (1), 13.

POPPE H., DEN BOEF G., FREESE F., 1970. On the use of the protolytic effect of complexation reactions for the indication of end points in complexometric titrations. *Anal. Chim. Acta*, **51** (2), 199-207.

PRIBIL R., 1957. Komplexony v Chemicke Analyse, Nakladatelstvi, C.S.R. *Akad. Ved.*, Praha.

RINGBOM A., PENSAR G., WÄNNINEN E., 1958. A complexometric titration method for determining calcium in the presence of magnesium. *Anal. Chim. Acta*, **19** (6), 525-530.

RINGBOM A., 1967. *Les complexes en chimie analytique*. 369 p. Ed. Dunod.

SADEK F. S., SCHMID R. W., REILLEY C. N., 1959. Visual EGTA titration of calcium in the presence of magnesium. *Talenta*, G. B., **2** (1), 38-51.

SCHMID R. W., REILLEY C. N., 1957. *Anal. Chem.*, **29**, 264-268.

SCHWARZENBACH G., 1956. *Die komplexometrische Titration*, 2e édit., F. Enke Verlag, Stuttgart.

SHAFFER L. H., KNIGHT R. A., SMITH D. A., 1967. Photometric procedure for a chelometric analysis for calcium in the presence of a large excess of magnesium. *Desalination*, Netherl., **2** (1), 125-129.

WHITFIELD M., LEYENDEKKERS J. V., 1969. Liquid ion-exchange electrodes as end point detectors in complexometric titrations. Determination of calcium and magnesium in the presence of sodium. *Anal. Chim. Acta*, **46** (1), 63-70.

ZALESSKY Z., DEBRAS-GUEDON J., VOINOVTICH I. A., 1960. Dosage direct de calcium et de magnésium en présence de fer, aluminium et titane par le sel disodique de l'acide éthylène diaminetétracétique (EDTA). *Anal. Chim. Acta*, **23** (6), 523-530.

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (1), 25-37.

Etude du taux d'oxygène dissous et de divers paramètres dans un effluent d'eaux résiduaires domestiques traité par lagunage

F. SAUZE

Station d'Œnologie et de Technologie Végétale, I.N.R.A., 11104 Narbonne CEDEX BP 72

Résumé

Dans le cadre d'une étude générale de fonctionnement épuratoire d'une installation de lagunage d'eaux usées domestiques, une analyse a été faite des variations annuelles et journalières du taux d'oxygène dissous en relation avec celles d'autres paramètres importants de la biodégradation : consommation d'oxygène, développement des algues.

L'objectif était de préciser les réactions du milieu sous l'influence de facteurs externes, tels que l'énergie lumineuse reçue, ainsi que les rapports de la croissance algale avec d'autres paramètres de l'épuration.

La méthode a consisté à mesurer *in situ* chaque paramètre en plusieurs points déterminés de la masse liquide et à intervalles réguliers, au cours d'un cycle annuel et d'un cycle de 24 heures, puis à confronter entre elles leurs courbes de variations.

On constate que l'oxygénation au cours du lagunage est très élevée, et que son évolution aux différentes époques de l'année est dans une certaine mesure en corrélation avec l'énergie lumineuse incidente. Les résultats permettent de penser que la photosynthèse par les algues joue le rôle principal dans l'oxygénation du milieu.

Les variations au cours des 24 heures et en fonction de la profondeur dans la tranche d'eau montrent que l'alternance de lumière et d'obscurité n'entraîne qu'une fluctuation modérée de l'oxygénation; le milieu demeure donc en majeure partie homogène et aerobie, conditions favorables à l'épuration.

Mots clés : *Eaux résiduaires — Oxygène dissous.*

I. — But des recherches

Des recherches assez nombreuses sont entreprises aujourd'hui sur l'auto-épuration en milieu lagunaire, motivées à la fois par la croissance des rejets de pollution organique dans les rivières et les étangs, et par les projets de

mise en valeur de ces plans d'eaux par l'aménagement touristique, l'aquaculture, etc.

Un milieu spécialement intéressant s'offre pour l'étude des processus d'épuration et de réoxygénation, il s'agit des effluents d'eau résiduaire urbaine en fin de traitement par lagunage : la charge organique importante des effluents bruts, ainsi que l'échelle de temps dans laquelle s'effectue l'épuration, font que les phénomènes bio-chimiques, pourtant aussi complexes que dans les plans d'eau naturels, y sont néanmoins plus intenses et moins difficiles à saisir.

Certaines caractéristiques de l'effluent traité, notamment la charge organique résiduelle, la masse planctonique, le taux d'oxygène dissous, sont particulièrement importantes à étudier en raison de l'impact qui peut en résulter sur les milieux récepteurs, précisément dans le cas de plans d'eau tels que lacs et étangs naturels.

Le mécanisme de la production et de la consommation d'oxygène dans le milieu liquide des bassins de stabilisation a été étudié par de nombreux auteurs étrangers (USA, Union Sud-Africaine, Inde, Australie) qui ont mis notamment en évidence le rôle important de la photosynthèse par le phytoplancton dans le milieu. Certains ont tenté de relier les variations du degré d'oxygénation à celles de facteurs primaires ou de facteurs intermédiaires susceptibles d'intervenir dans ces variations.

Le but de nos propres recherches n'est pas une mise en évidence supplémentaire du mécanisme d'oxygénation par la photosynthèse, mais l'analyse de son effet sur les paramètres servant habituellement à contrôler le degré d'épuration, essentiellement l'oxygène dissous et la demande d'oxygène, en y ajoutant autant que possible la croissance algale dont il est possible de montrer l'influence sur l'intensité de l'épuration. Il est notamment nécessaire pour celà de vérifier, tout en les précisant, les connaissances sur les variations de ces paramètres dans le temps, *in situ*. Ces variations traduisent évidemment la réponse du milieu liquide aux facteurs externes, notamment à l'énergie lumineuse reçue à la surface des bassins. Nous nous sommes efforcés notamment de combler une lacune propre à la plupart des recherches précitées, qui se fondent sur des *mesures effectuées de jour seulement et ne peuvent de ce fait fournir de valeurs réelles* du taux d'oxygène moyen.

Il est également à noter que les travaux antérieurs où sont étudiés ces facteurs ont été effectués soit dans des stations de lagunage situées dans divers pays étrangers, soit en laboratoire sur des modèles réduits de bassins. Des recherches homologues étaient donc nécessaires d'une part sous les climats français, d'autre part sur une installation réelle.

Conçus pour faciliter l'expérimentation, les bassins du Grau-du-Roi, département du Gard, sont opérationnels et en service depuis plusieurs années. Cette installation a déjà permis d'effectuer *in situ* des études de fonctionnement général de l'épuration (SAUZE, 1975) dans un but pratique de développement du procédé, et a été étendue et modernisée au début de 1974 (20 ha de bassins). Il a été possible ainsi, tout en poursuivant l'étude de fonctionnement, d'approfondir de 1974 à 1976 certains aspects plus scientifiques des processus épuratoires.

Un premier travail est constitué par les essais relatés ci-dessous.

II. — Conditions des essais matériels et méthodes utilisées

II-1. — *Conditions atmosphériques*

Ces conditions ont été dans l'ensemble les suivantes au cours des essais :

— Vent : 1 à 3 Beaufort.

— Température :

moyenne des minima journaliers : 8,4 °C,
moyenne des maxima journaliers : 18,3 °C.

— Fort ensoleillement en été (voir graphiques d'énergie solaire incidente).

— Luminosité assez élevée en hiver, très élevée en été.

Au cours des trois journées de mesures sur cycle journalier, au printemps et en été, les conditions ont été les suivantes :

— Temps stable, beau et sec.

— Vent quasi nul, permettant un état calme du milieu liquide des bassins.

II-2. — *Mesures effectuées*

Il a été procédé à deux séries de mesures sur le milieu liquide :

— Mesures périodiques au cours du cycle annuel.

— Mesures au cours du cycle journalier.

II-21. — *Les mesures au cours du cycle annuel étaient effectuées à des intervalles de deux à trois semaines selon les saisons, par prélèvement d'eau à l'entrée et à la sortie de chacun des trois bassins d'une série : points 1b à 5b* (SAUZE, 1975)

Les analyses ont porté sur les paramètres suivants :

— Énergie solaire incidente (reçue en surface) : courbe de variations sur un an relevée en 1975-1976 ci-dessous.

— Température de l'eau.

— Oxygène dissous (mesuré à la sonde oxymétrique à lecture directe à 0,20 m au-dessous de la surface du liquide).

— Concentration algale (nombre/ml).

II-22. — *Les mesures périodiques au cours du cycle journalier étaient effectuées par prélèvement d'eau dans le troisième bassin de la série.*

Enregistrement continu, et calcul de moyennes journalières ou horaires, pour les paramètres suivants.

— Énergie solaire incidente.

Cette mesure n'a pu être effectuée sur le lieu même des expériences. Toutefois, il est admissible d'utiliser des courbes enregistrées à Sète, ville distante de

25 km à la même latitude, par le CTGREF de Montpellier. Le ciel est resté exempt de nuages dans les deux localités, Grau-du-Roi, et Sète durant les enregistrements de 24 heures. La variation annuelle de l'intensité d'énergie, dont le graphique donne à titre d'exemple la courbe en 1975-76, ne varie guère d'une année à l'autre, les maxima et minima se situant toujours en décembre et en juillet.

Appareil utilisé : solarimètre enregistreur Kipp et Zonen CM5, cellule au selenium Enraf Nonius 300 à 2 500 manomètres.

— Oxygène dissous en surface, et en profondeur (0,20 m et 0,80 m à partir de la surface), à l'oxymètre enregistreur Ponselle. Hauteur d'eau totale dans le bassin : 1 à 1,10 m.
— Température de l'eau au thermomètre-sonde enregistreur Ponselle.

Prélèvement de 6 échantillons moyens de 4 heures par échantillonneur automatique, et mesure au laboratoire des paramètres suivants :

— DB05, mesurée par la méthode normalisée, sur échantillon brut, non décanté, norme AFNOR T 90-103.
— Concentration algale (nombre/ml), mesurée par la méthode de dilution, numération à la lame compte-globule type cellule de Malassez.

Répétitions : les valeurs fournies pour chaque paramètre sont les moyennes de trois mesures, effectuées en mars, juin et octobre, chacune étant répétée en 4 points régulièrement disposés dans le bassin.

III. — Résultats

III-1. — *Variations annuelles du taux d'oxygène dissous*

Le contrôle d'évolution annuelle du taux diurne a été effectué à partir de mai 1974 pendant une période de 9 mois, et a fourni les résultats reportés sur le graphique de la figure 1. Le contrôle du fonctionnement de la station a continué en fait jusqu'en décembre 1975, mais sur d'autres séries de bassins qui ont dû être mises en service en raison de travaux de réfection.

Le taux obtenu au point de sortie s'est situé constamment à un niveau voisin de celui de la saturation, compte tenu des variations de température, avec une seule période de basses concentrations durant la pointe de charge de juillet-août, et un abaissement assez léger, jusqu'à 7 ou 8 mg/l, durant certains mois d'automne ou d'hiver (novembre, janvier). La position relative des courbes correspondant aux divers stades du traitement était en gros la même que celle observée dans l'expérience de 1970 (Sauze, 1973).

Ces courbes montrent que malgré certaines variations, localisées dans le temps, de plusieurs paramètres susceptibles d'influer sur le stock d'oxygène dans le milieu, en particulier accroissement de la demande d'oxygène en été, réduction de la luminosité en hiver, ce stock conserve presque toute l'année une valeur suffisante pour assurer un état du milieu favorable à la biodégradation aérobie.

La courbe annuelle du nombre d'algues, non reproduite, mais qui a été également établie, fait apparaître une légère dépression en hiver, qui peut être imputée à la fois à la réduction de nutriments organiques ou minéraux disponibles au cours de cette période creuse de la pollution, et peut-être aux plus faibles valeurs de la

température et de la luminosité à cette saison, dans la mesure où le nombre d'algues peut être en corrélation avec l'activité photosynthétique. La courbe annuelle d'intensité lumineuse en cal/cm²/j accuse des fluctuations coïncidant dans une certaine mesure avec le nombre d'algues, surtout en hiver.

Toutefois, les recherches consistant à suivre l'évolution des divers paramètres de l'état du milieu au cours d'une certaine période, même étendue au-delà d'un seul cycle annuel, ne permettent que difficilement de mettre en évidence l'influence de l'énergie lumineuse reçue par les bassins. La variation saisonnière de l'éclairement est en effet trop faible, et par ailleurs des mesures effectuées à un seul niveau dans la masse liquide ne révèlent pas ce qui se passe dans les couches

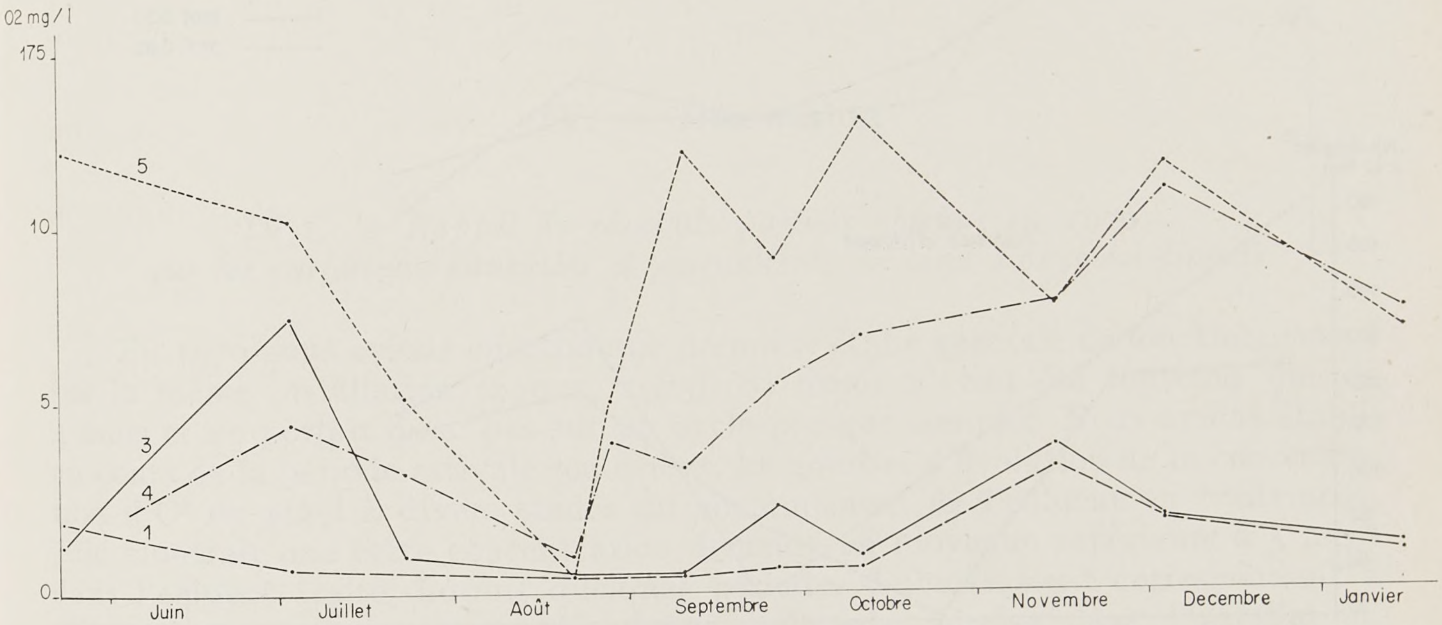


FIG. 1. — *Variations au cours de l'année du taux d'oxygène dissous dans une série de trois bassins de lagunage.* SAUZE, 1975.

Mesures à 0,20 m de profondeur à partir de la surface, à 10 heures du matin.

Points de mesure :

1, avant arrivée dans le premier bassin (effluent non traité),

3 à 5 : sortie de chacun des trois bassins de la série.

profondes où les radiations pénètrent beaucoup plus difficilement. GLOYNA (1968) a indiqué que l'intensité de l'oxygénation diurne est probablement plus influencée par les variations des espèces constituant la population en algues que par celles de l'intensité lumineuse.

Ce sont donc principalement les résultats des mesures portant sur les variations du taux d'oxygène au cours d'un cycle de 24 heures, qui peuvent mettre en évidence la réponse du milieu liquide à une ample variation de luminosité.

III-2. — *Variation journalière de l'oxygène dissous en surface et en profondeur*

Les courbes représentatives (fig. 2) des taux en mg/l observés aux deux profondeurs présentent un maximum assez étalé entre 12 et 19 h, correspondant à des heures de forte luminosité. La température de l'eau influe faiblement sur l'amplitude de variation du taux (7 p. 100 environ), du fait qu'elle ne varie qu'entre 6 et 11° sur la période de 24 heures.

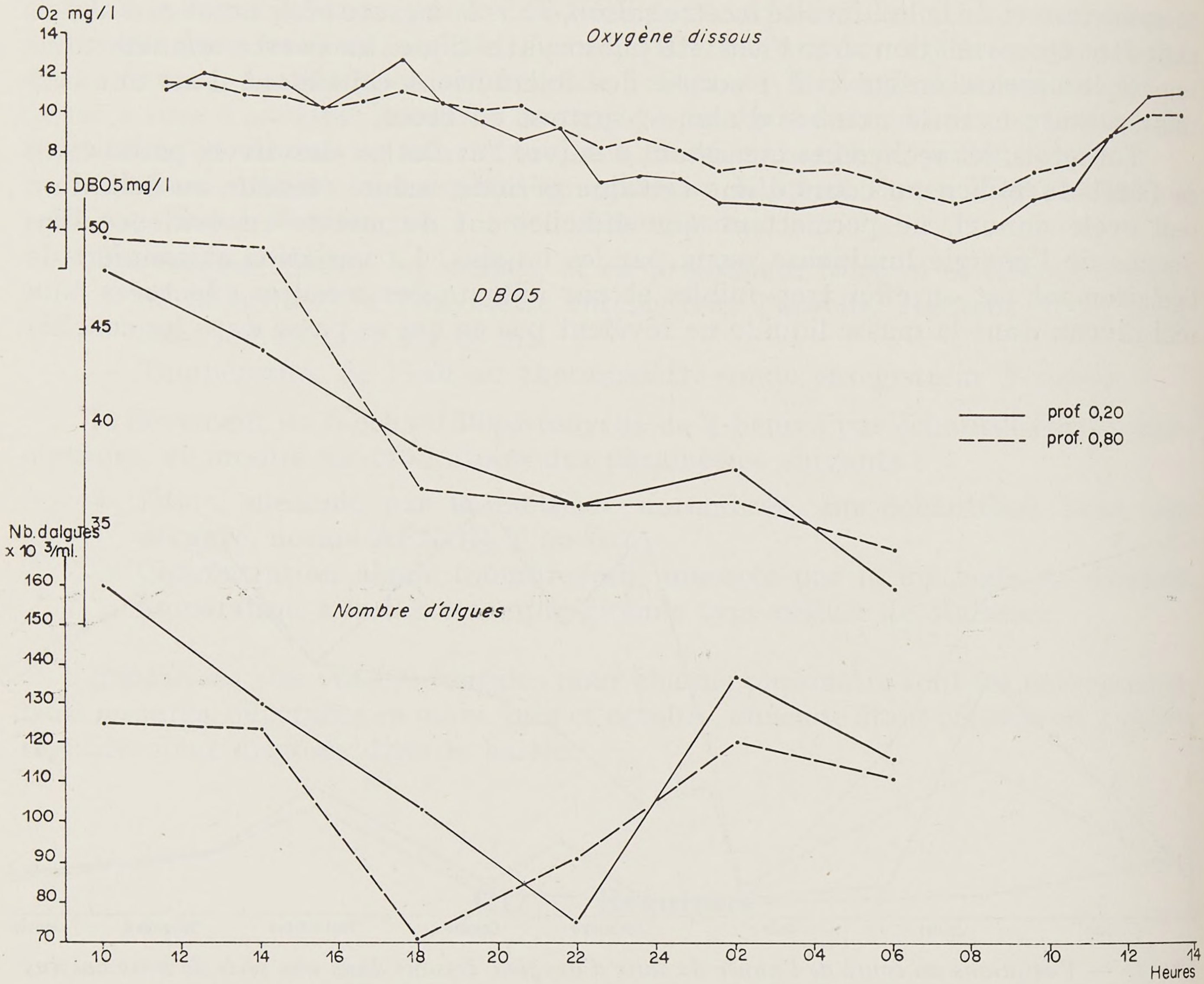


FIG. 2. — *Variations journalières de trois facteurs dans un bassin terminal de lagunage (oxygène dissous, DBO5, nombre d'algues).*

Chacune des courbes se referme approximativement sur elle-même en fin de cycle. Les moyennes des taux en surface et en profondeur sont assez peu différentes.

Durant les heures de forte luminosité, la différence varie de 1 à 12 p. 100 en moins par rapport au taux en surface. La nuit, l'ordre peut s'inverser et le taux en profondeur dépasse de 10 à 20 p. 100 le taux en surface. Le phénomène a été néanmoins d'une durée variable au cours des répétitions de l'expérience, et ne s'est pas produit dans l'une d'elles.

III-3. — *Variations de la DBO5*

Ce paramètre présente également une variation cyclique, le maximum se situant entre 9 et 13 h, le minimum entre 22 et 8 h (fig. 2). L'amplitude de variation journalière de la DBO5 par rapport à la moyenne est d'environ 45 p. 100.

Les résultats des mesures de DCO correspondantes montrent une variation très analogue de ce paramètre.

III-4. — *Variation du nombre d'algues par unité de volume*

L'amplitude de ces variations (fig. 2) est de l'ordre de 40 à 50 p. 100 par rapport à la moyenne. Le nombre passe par un maximum entre la fin de la matinée et le début de l'après-midi, ce qui correspond à la période de luminosité maximale.

Bien qu'il paraisse s'agir d'une variation cyclique, ressemblant à celle de la demande d'oxygène, les minima des deux paramètres sont fortement décalés (8 h environ). Le nombre d'algues en profondeur est un peu plus faible qu'en surface, en moyenne de 15 à 20 p. 100.

IV. — Discussion

IV-1. — *Rappel de résultats partiels obtenus en 1970 sur les variations annuelles et journalières du taux d'oxygène dissous*

En 1970 nous avions effectué une première étude générale de fonctionnement sur la même installation (SAUZE, 1973). Sa durée n'avait été toutefois que de 4 mois et ne portait donc pas sur un cycle presque complet. Nous avions établi, au cours de la période estivale seulement, les courbes d'évolution de la concentration d'O^2 en mg/l à divers stades du cheminement de l'effluent en traitement. Elle montrait que cette concentration demeure en moyenne supérieure à 5 mg/l dans l'effluent traité, hormis quelques périodes d'abaissement correspondant à d'importants accroissements de charge polluante admise dans l'installation. Durant les heures de fort éclairement diurne, la concentration est contamment égale ou supérieure à celle de la saturation.

L'oxygénation, à partir d'un taux voisin de zéro observé dans l'eau d'égoût non traitée, a donc pu être estimée importante. Par ailleurs, il a été observé que la concentration augmente à peu près régulièrement au cours du traitement, la courbe d'évolution correspondant au point de sortie se situant constamment au-dessus des courbes relatives aux autres points de prélèvement.

Des mesures de variation dans la journée, mais non sur 24 h, avaient montré que l'oxygénation la plus forte était obtenue pendant les heures de forte luminosité (toutefois l'énergie solaire incidente n'était pas mesurée), et que les courbes obtenues à différentes profondeurs restaient sensiblement parallèles.

IV-2. — *Interprétation des résultats de 1974-1975*

IV-21. *Différence de taux d'oxygène surface-fond et jour-nuit*

En valeur moyenne sur 24 heures, le taux d'oxygène est assez peu différent aux deux niveaux observés; la différence de 5,4 mg/l (soit près de 10 %) relevée est néanmoins significative. On peut cependant observer que la possibilité d'un taux d'oxygène un peu plus élevé en profondeur va à l'encontre de ce que l'on observe souvent dans les plans d'eau naturels ou artificiels. On sait en effet que l'oxygène provient d'une part d'un apport en surface, assez limité, fourni par

l'atmosphère, et d'autre part de la photosynthèse algale qui exige la pénétration de la lumière.

Compte tenu de l'allure comparée et du recoupement des deux courbes en deux points, tout semble se passer comme si la variation de l'oxygénation en profondeur était retardée de quelques heures et en outre amortie par rapport à la variation de celle observée près de la surface (minimum plus élevé la nuit, maximum moins élevé le jour).

Cependant les apports d'oxygène par l'air ou par photosynthèse ne sont pas seuls en cause, et le bilan global dépend également de la consommation d'oxygène, mesurée par les variations de la DBO5 et de la DCO. Celle-ci, de plus, dépend d'un certain processus d'échanges avec la couche de sédiments qui est anaérobie.

Il peut également se produire des mouvements de convection dus à de légères différences de température entre les couches superficielles et profondes.

On observe certainement, en résumé, la résultante d'un ensemble complexe de phénomènes.

Gloyna (1968, 1972) a pu, à l'aide de mesures dans des bassins de lagunage facultatif, déterminer les gradients de divers facteurs, dont l'oxygène dissous, la température et le pH, selon une section verticale de la masse liquide, et établir les courbes correspondantes. Ces mesures, effectuées de jour, ont montré que la variation de température est faible, dans le cas des hauteurs d'eau habituelles (1 m à 1,50 m), mais que l'oxygène diminue de façon sensible vers les couches inférieures, corrélativement à une réduction de pénétration de l'énergie lumineuse. Cependant, les mesures étaient faites d'une façon instantanée et non sur 24 heures, ce qui ne permettait pas d'observer la variation des phénomènes au cours de ce cycle. On ne trouve dans la littérature aucun compte rendu d'expérience faite avec cet intervalle de temps, et les études d'évolution de la biocénose en milieu aquatique très pollué sont elles-mêmes peu nombreuses.

On peut toutefois citer ici certaines conclusions issues d'études effectuées dans les étangs naturels, notamment par le CTGREF, en 1972-1974, selon lesquels la teneur dans les fonds — pourtant un peu plus profonds que ceux des bassins de lagunage — n'est inférieure que de 1 ou 2 mg/l à celle de la surface (environ 7 mg/l), et ne provoque pas de phénomènes d'anaérobiose. Les études générales concernant les eaux des rivières et plans d'eau ont également conduit à analyser la répartition de l'oxygène et ses facteurs (Dussart, 1966).

Les autres études sont relatives à de grands lacs (Feuillade, 1970; Balvay, 1972) et ont évidemment fait apparaître des gradients d'amplitude plus importante, mais les conditions sont ici trop différentes de celles des étangs.

De toute façon, la constatation globale et essentielle issue de l'expérience du Grau-du-Roi est que les taux moyens aux deux niveaux étudiés n'offrent entre eux qu'une différence assez faible, excepté peut-être durant quelques heures nocturnes, ce qui est avantageux du point de vue de l'efficacité d'épuration. Des mesures effectuées sur les sédiments dans d'autres expériences au Grau-du-Roi ont montré que ce n'est guère qu'à proximité de l'interface liquide-sédiments que la chute du taux d'oxygène devient notable.

Lorsqu'il existe des facteurs externes favorisant le brassage du liquide, soit naturel comme par le vent, soit artificiel comme par l'agitation mécanique pratiquée dans le lagunage aéré, il est probablement possible d'atteindre une homogénéité totale du milieu du point de vue de l'oxygène dissous.

On peut conclure toutefois que même en l'absence de brassage, sous un climat et à une époque assez ensoleillée, le milieu traité en bassin de stabilisation dit facultatif reste en fait suffisamment homogène du point de vue de l'aérobiose

dans une tranche d'eau de 0,80 m, sous réserve bien entendu que la charge en DBO5 demeure normale par rapport à la capacité de l'installation (dans le cas présent, environ 70 kg/ha/j.).

Il serait utile de faire ultérieurement la même expérience :

— dans les bassins où la hauteur d'eau est plus importante, supérieure à 1 m ou 1,20 m, ce cas étant cependant assez rare en lagunage facultatif classique et se rencontrant surtout en lagunage anaérobie;

— sous une charge admise plus importante;

— sous un climat où les facteurs ambiants sont différents (température de l'air, luminosité, vent).

Enfin la comparaison de la courbe journalière de l'oxygène et de celle de l'énergie incidente (fig. 3) permet de penser qu'une corrélation existe entre ces

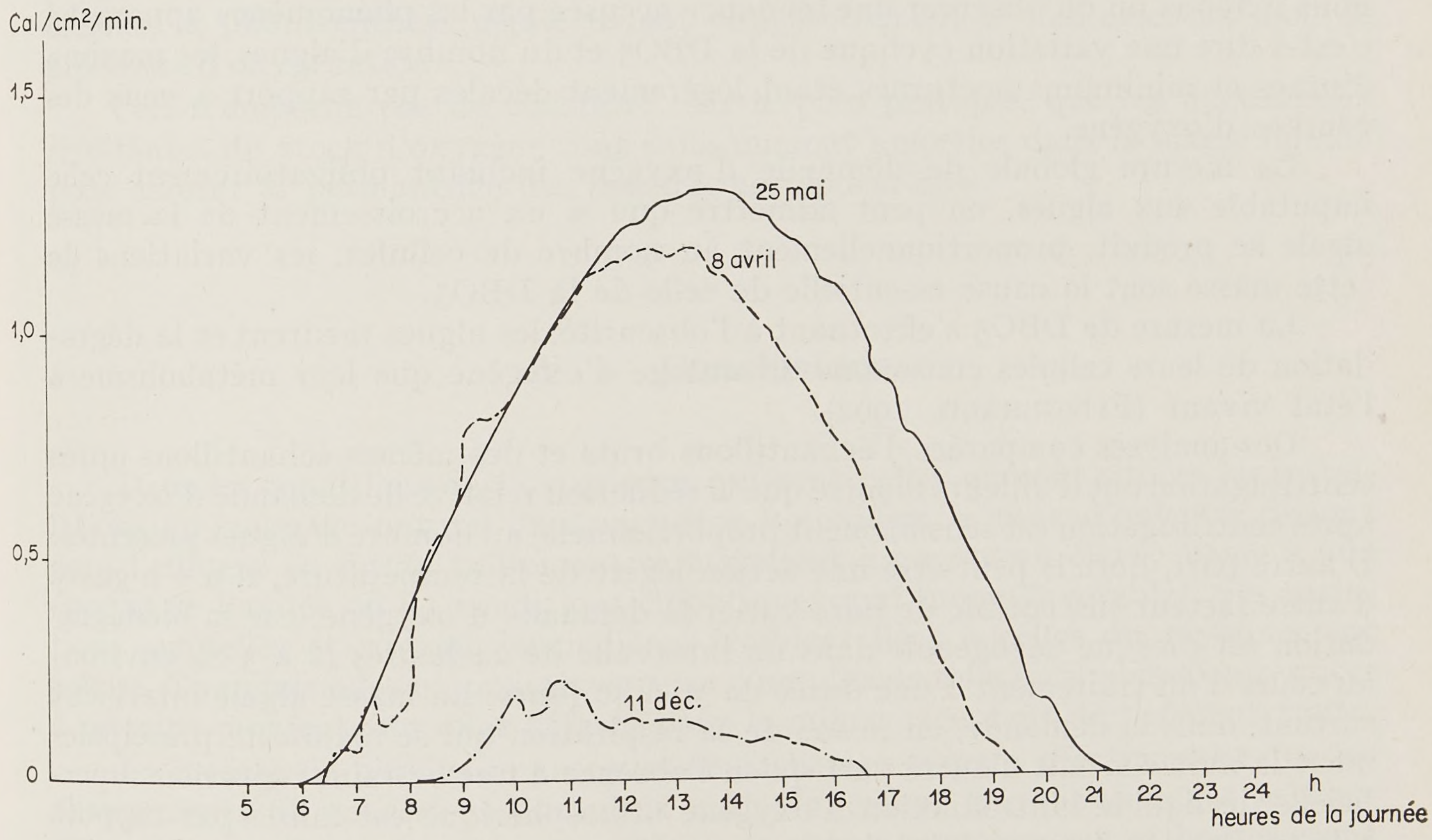


FIG. 3. — *Variation journalière de l'énergie solaire reçue.*

(Exemple de courbes relevées à des dates différentes de l'année — Courbe du 23 mai : même jour que l'une des mesures de variations journalières des trois facteurs, représentés fig. 2. Courbes enregistrées à Sète, et communiquées par le C.T.G.R.E.F.)

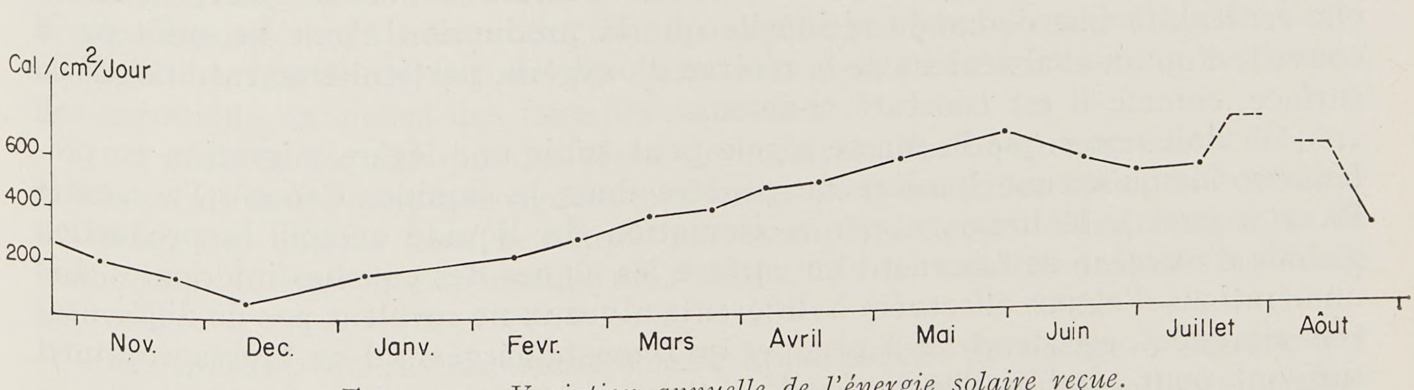


FIG. 4. — *Variation annuelle de l'énergie solaire reçue.*

(Enregistrée à Sète, de novembre 1975 à août 1976, et communiquée par le C.T.G.R.E.F.).

deux facteurs, avec un léger décalage horaire qui traduit l'inertie de phénomènes biochimiques. Nous n'avons pu tirer de conclusion aussi nette de la confrontation des courbes annuelles, celle de l'oxygène dissous ayant subi une perturbation importante en été; il s'est produit en effet un passage brutal à l'anaérobiose, dû à la fois à une surcharge organique et à des températures supérieures à 25 °C ayant entraîné la disparition des algues. Toutefois la décroissance moyenne qui a suivi, de septembre à février, est à rapprocher de la dépression d'énergie incidente observée en hiver (fig. 4).

IV-22. *Inter-relations de l'oxygène dissous, de la demande d'oxygène, et de la croissance algale*

Faute de pouvoir faire un bilan complet production-consommation d'oxygène, nous n'avons pu qu'observer une tendance accusée par les phénomènes apparents, c'est-à-dire une variation cyclique de la DBO5 et du nombre d'algues, les maxima diurnes et minimums nocturnes étant légèrement décalés par rapport à ceux des courbes d'oxygène.

La mesure globale de demande d'oxygène incluant obligatoirement celle imputable aux algues, on peut admettre que si un accroissement de la masse algale se produit, proportionnellement au nombre de cellules, les variations de cette masse sont la cause essentielle de celle de la DBO5.

La mesure de DBO5 s'effectuant à l'obscurité, les algues meurent et la dégradation de leurs cellules consomme davantage d'oxygène que leur métabolisme à l'état vivant (Fitzgerald, 1962).

Des analyses comparées d'échantillons bruts et des mêmes échantillons après centrifugation ont d'ailleurs montré que la réduction relative de demande d'oxygène après centrifugation est sensiblement proportionnelle au nombre d'algues présentes. D'autre part, hormis peut-être une action légère de la température, il n'y a guère d'autre facteur susceptible de faire varier la demande d'oxygène, car la biodégradation est presque négligeable dans un intervalle de 24 heures (2 à 3 % environ) au cours d'un traitement d'une durée de 30 à 40 jours. La masse algale intervient surtout, dans la demande, en raison de sa respiration qui se manifeste principalement la nuit. On sait d'autre part qu'en l'absence d'une certaine agitation superficielle de liquide l'introduction d'oxygène atmosphérique est faible par rapport à la production interne due à la photosynthèse. On peut donc admettre que les apports ou les absorptions d'oxygène sont essentiellement le fait des algues, et que la variation de leur masse peut déterminer en grande partie celle du stock d'oxygène dans le liquide.

Bien que la DBO5 globale soit elle-même faible durant les heures de nuit, elle représente une demande résiduelle que la production algale ne suffit pas à couvrir, d'où un abaissement de la réserve d'oxygène, particulièrement marqué en surface, comme il est constaté ci-dessus.

On doit noter que la masse algale peut subir une légère migration en profondeur lorsqu'aucune lumière ne pénètre dans le liquide. Comme l'a montré Bartch (1961), le brassage par recirculation du liquide accroît la production globale d'oxygène en ramenant en surface les algues des couches inférieures. Les numérations d'algues effectuées à différents niveaux ne revèlent pas de différences très marquées; ceci tendrait à prouver qu'il existe en général un brassage naturel suffisant pour rétablir l'homogénéité.

La température et la luminosité, enfin, constituent elles-mêmes des facteurs

capables de limiter la croissance algale, et OSWALD (1953) a montré que par temps chaud et très forte intensité lumineuse on assiste à une décantation naturelle de cellules mortes. Ceci cadre d'ailleurs avec l'existence d'une plage optimale de ces facteurs, correspondant à la croissance cellulaire maximale.

Certes les interprétations qui précèdent supposent que les variations numériques des cellules d'algues puissent constituer un indice de celles de leur masse globale. Or la croissance n'est pas forcément liée à tout moment à la division cellulaire, qui ne se produit qu'au cours de phases particulières. Des mesures statistiques montrent toutefois que le diamètre moyen des cellules ne varie guère dans une journée, ce qui entraîne une certaine proportionnalité entre la masse et le nombre. Seules des numérations et pesées réalisées sur cultures pures permettraient de vérifier ces hypothèses.

Quoi qu'il en soit, le phénomène important mis en évidence au paragraphe précédent, est la relation entre l'énergie reçue par le liquide et sa teneur en oxygène dissous, la photosynthèse algale jouant obligatoirement le rôle essentiel dans le processus d'oxygénation.

Ceci n'empêche pas de constater, sur le plan pratique, que les fluctuations résultantes du stock d'oxygène sont suffisamment amorties dans la masse liquide pour assurer la permanence des mécanismes épuratoires.

V. — Conclusions

Dans les conditions de l'expérience qui sont celles où sont situées les installations de lagunage naturel du Languedoc-Roussillon, le taux d'oxygène dissous dans l'effluent en fin de traitement se maintient à un niveau élevé, même à une époque de l'année où les conditions climatiques sont moins favorables. Ses variations annuelles et surtout journalières semblent liées à celles du rayonnement solaire. Toutefois elles n'apparaissent pas d'amplitude telle qu'il puisse en résulter à certains moments un effet néfaste pour le milieu récepteur de l'effluent traité.

La mesure de variations au cours de 24 heures montre effectivement que les changements de conditions durant la nuit n'affectent que modérément le taux d'oxygène (en % du taux de saturation), sa valeur moyenne sur 24 heures étant peu inférieure à sa moyenne durant les heures de jour.

Bien que le stock d'oxygène à un moment donné résulte d'un ensemble complexe de phénomènes, les variations de la demande d'oxygène et de la prolifération des algues, simultanément avec celles du taux d'oxygène, semblent confirmer le rôle prépondérant de la production d'oxygène par photosynthèse algale. Cette constatation résulte de l'étude des variations journalières, et moins nettement des variations annuelles des facteurs en cause.

On peut en déduire que des séries de mesures effectuées uniquement le jour et à la même heure sont à la rigueur suffisantes pour rendre compte de l'évolution du milieu des bassins dans le temps, par exemple au cours d'une campagne de traitement. Il était indispensable de s'assurer de la validité de cette méthode approchée.

Les mesures de rayonnement solaire apparaissent de nature à préciser les conditions dans lesquelles s'est trouvé l'écosystème constitué par le milieu en traitement. Cette donnée pourrait ultérieurement permettre d'amorcer des recherches

sur la corrélation pouvant exister entre la productivité primaire du lagunage et la quantité d'énergie reçue de l'extérieur par les bassins.

Des différences se manifestent entre les taux d'oxygène relevés à deux niveaux, l'un proche de la surface et l'autre du fond du bassin. Toutefois ce phénomène ne se produit guère que la nuit, et la différence moyenne au cours des 24 heures reste faible.

On peut en déduire :

— que même en lagunage dit facultatif, où la hauteur d'eau de 1 m à 1,20 m est telle que des conditions anaérobies existent en principe dans les couches profondes, la zone aérobie intéresse en fait la quasi-totalité de la tranche d'eau près de la sortie du bassin terminal; ceci tout au moins lorsque la concentration résiduelle exprimée ici en DBO5 ne dépasse pas une certaine valeur, ici 40 mg/l en moyenne.

— qu'une forte agitation du liquide, par le vent ou par brassage artificiel, n'est pas indispensable pour que la réoxygénation ou l'homogénéisation de l'oxygène dans la masse soit assurée de façon satisfaisante, déterminant un niveau correct du pouvoir épurateur et de la qualité de l'effluent sortant.

Il est vraisemblable que le brassage s'effectue de façon spontanée dans le liquide, grâce en partie à des phénomènes résultant des différences de conditions entre le jour et la nuit.

Reçu pour publication en janvier 1977.

Remerciements

Ce travail a été effectué au cours d'une mise à disposition du Service Régional de l'Aménagement des Eaux du Languedoc-Roussillon.

Nous tenons à remercier les Services du Ministère de la Qualité de la Vie et de l'Environnement qui ont permis le financement des études de fonctionnement des bassins de stabilisation (crédits du FIANE délégués au S.R.A.E. du Languedoc-Roussillon); l'Institut Bouisson-Bertrand de Montpellier, qui a effectué les analyses d'eau; et le C.T.G.R.E.F. (Section Aménagements Littoraux et Aquaculture), qui m'a communiqué les enregistrements de rayonnement solaire.

Summary

Study of the liquid oxygen rate and some other parameters in a waste water effluent after lagoonal treatment

In the framework of a general study concerning the functioning of a waste water lagooning installation we analyzed the annual and daily variations of the liquid oxygen rate in relation with those of other important parameters of biological degradation: oxygen consumption and algae propagation.

We aimed at determining the reactions of the medium under the influence of external factors such as the received luminous energy as well as the relations between the algal growth and other purification parameters.

The method consisted in measuring each parameter in situ in different determined points of the liquid mass at regular intervals during an annual cycle and a cycle of 24 hours. Their variation curves were then compared. We stated a very high oxygenation during the lagoonage. Its evolution during the different periods of the year is, to a certain extent, in correlation with the incident luminous energy.

The results allow to suppose that the photosynthesis by the algae plays the major role

in medium oxygenation. The variations during the 24 hours' cycle and depending on the water depth show that the alternance of light and darkness leads only to a moderate oxygenation fluctuation.

Therefore the medium remains for the most part homogeneous and aerobic and thus provides favourable purification conditions.

Références bibliographiques

BALVAY, 1972. Évolution de la biocénose du lac d'Annecy. *Ann. Hydrobiol.*, **3** (2), 93-116.

BARTSCH A. F., 1961. Algae as a source of oxygen in waste treatment. *J. Water Poll. Contr. Fed.*, **33**, 239-249.

C.T.G.R.E.F. (Ministère de l'Agriculture), 1972-1974. Rapport d'étude des grands étangs africains.

DUSSART B., 1966. *Limnologie : l'étude des eaux continentales*, Gauthier-Villard, 667 p.

FEUILLADE J., 1970. Contribution à l'étude d'un lac de barrage : le lac de Vezins (Manche), 1963. *Rech. Hydrobiol. Cont.*, **1**, Thèse, Caen, 1 vol., 176 p.

FITZGERALD C. P., 1961. *The effect of algae on BOD measurements. Final reports to Institute of Health*, Madison, Univ. of Wisconsin.

GLOYNA E. F., 1968. *Advances in water quality improvement.* Water Ressources Symposium (1), Univ. Texas, Austin, Tex. 409-426.

GLOYNA E. F., 1972. *Bassins de stabilisation des eaux usées.* Public. de l'Organisation Mondiale de la Santé. Genève. 1 vol. 187 p.

I.R.C.H.A. Rapport d'une étude sur l'épuration poussée par les algues (Étude pour le Ve Plan).

OSWALD W. J., 1953. *Algae symbiosis in oxydation ponds.* Part. III. *Photosynthetic oxygenation.* Sew. and Ind. Waste **25**, 1, 26-27.

SAUZE F., 1973. Étude du pouvoir épurateur dans les étangs de stabilisation. *Trib. Cebedeau.* (**353**), 161-177.

SAUZE F., 1975. Étude du fonctionnement des bassins de stabilisation du Grau-du-Roi, S.R.A.E. du Languedoc-Roussillon (Ministère de l'Agriculture) Montpellier, 38 p.

HARTLEY W. R. et WEISS C. M., 1970. Light intensity and the vertical distribution of algae in tertiary oxydation ponds. *Water Res.*, **4**, 751-763.

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (1), 39-58.

Etude du coefficient de vitesse de dégradation caractérisant l'évolution des eaux polluées lagunées Dégradation des charges organiques

F. SAUZE

avec la collaboration technique de R. GAMET* et M. GERVAIS**

Station d'Œnologie et de Technologie végétale,
11104 Narbonne

* *Service régional d'Aménagement des Eaux du Languedoc-Roussillon*
** *Bureau Central d'Études pour les Équipements d'Outre-Mer (B.C.E.O.M.)*

Résumé

Des mesures régulières d'élimination de la matière organique dans plusieurs installations de lagunage du Languedoc, au cours de cycles annuels de fonctionnement, ont permis d'étalonner dans les conditions locales un modèle cinétique où intervient la constante de vitesse de régression K de la DBO_5 au cours du traitement.

La validité du modèle établi par des chercheurs de divers pays, sous d'autres conditions climatiques, est contrôlée tant pour le premier bassin d'une série que pour l'ensemble des trois bassins constituant les séries. Ce résultat conduit à la détermination des valeurs de la constante K_1 relative aux bassins primaires, puis à la définition d'une constante globale K, utile pour fournir rapidement une valeur approchée de la superficie totale de bassin nécessaire au traitement.

Les valeurs des constantes K sont ensuite rapportées à la température moyenne du milieu au cours des périodes considérées, ce qui aboutit à l'ajustement d'un modèle de correction de température de forme exponentielle. En deçà d'un certain niveau de température, la courbe représentative s'éloigne peu de la courbe similaire établie d'après un modèle étranger.

A température égale, les vitesses de réaction dans les bassins de lagunage complet s'avèrent pratiquement les mêmes que dans ceux de lagunage tertiaire.

Un programme de recherches ultérieures est proposé, dont l'objectif est notamment d'étendre les résultats à d'autres conditions climatiques.

Mots clés : *eaux polluées, charges organiques, dégradation.*

I. — But des recherches et position pratique de la question

Le développement dans notre pays, sur des bases rationnelles, du procédé d'épuration des eaux résiduaires par lagunage exigera la connaissance de certaines caractéristiques fondamentales intervenant dans les réactions de biodégradation des polluants, et susceptibles de permettre la conception et le calcul dimensionnel optimal des bassins.

Beaucoup d'auteurs dans le monde ont tenté d'expliciter et quantifier la notion d'efficacité d'épuration par les procédés biologiques et, pour la plupart d'entre eux, la caractéristique fondamentale à considérer pour prévoir les rendements sous un climat donné est la « constante » de vitesse de dégradation ou de réaction de la charge polluante. C'est un paramètre ayant la grandeur inverse d'un temps, et désigné le plus souvent par K. Il est indépendant de la charge initiale exprimée par exemple en demande d'oxygène, mais fonction de la nature de l'effluent à traiter, ainsi que des conditions climatiques; il dépend notamment de la température de réaction, qui est influencée par le climat.

C'est cette donnée qui intervient, parmi d'autres, dans le calcul de la durée de traitement, c'est-à-dire de séjour ou plutôt de transit dans les bassins, ce qui permet de dimensionner les installations dans les conditions locales.

Bien que le facteur de pollution généralement adopté comme critère pour définir ce coefficient soit la DBO_5 (mesuré sur échantillon brut, non filtré), certains auteurs ont étudié les lois de réduction de divers autres facteurs, par exemple les matières en suspension, les « nutriments » et surtout les bactéries-tests de contamination fécale dans le cas des effluents d'égouts (MARAIS et SHAW, 1961). Il ressort de tous ces travaux que des coefficients de même définition peuvent être calculés en retenant comme critère ces différents facteurs, auxquels on peut ajouter la DBO_5 d'échantillons filtrés d'eau traitée, qui sont exempts de plancton.

Un nombre peu élevé d'installations de lagunage ayant été construit jusqu'à présent en France, leur conception s'est appuyée essentiellement sur de simples études de fonctionnement qui ont eu le mérite de dégrossir la technique. Il est donc indispensable de chercher à affiner la connaissance des lois d'élimination des matières polluantes, sous les conditions spécifiques des climats régionaux.

On doit à cet effet chercher à vérifier et adapter à ces conditions les modèles cinétiques établis hors de France et mis à l'épreuve pratique dans les installations de divers pays.

Le modèle le plus fondamental, dont l'emploi est devenu général aussi bien en lagunage naturel qu'en lagunage aéré artificiellement, est l'équation résultant des travaux d'ECKENFELDER (1961), de VAN ECK (1958), de MARAIS et SHAW (1961, 1966). Cette équation est elle-même tirée de la théorie mathématique de l'auto-épuration des cours d'eau établir par STREETER et PHELPS (1944) en application de la loi de CHICK ou formule monomoléculaire de décroissance de la pollution (réaction du premier ordre). Elle est du type hyperbolique si l'on prend comme variable la durée de séjour.

$$\frac{P}{P_0} = \frac{1}{1 + KR}$$

P étant la concentration des pollutions à l'instant considéré,
P_0 étant la concentration initiale,

R la durée de séjour dans le bassin jusqu'à cet instant, et
K la constante de vitesse de dégradation.

Le degré de pollution est exprimé le plus souvent en concentration de matières oxydables (mg/l).

Ce coefficient K est admis par les auteurs comme étant indépendant de la durée de séjour, tout au moins dans les conditions précisées ci-dessous. Si l'on connaît sa valeur moyenne pour le climat et la saison considérée, et en se fixant un certain taux d'épuration à obtenir, l'équation permet de calculer la durée de séjour nécessaire dans le bassin, et à partir de cette donnée la capacité nécessaire pour épurer un effluent de débit connu.

Plusieurs chercheurs ont déterminé, expérimentalement et statistiquement à l'aide de mesures sur un grand nombre de stations, des valeurs moyennes de K qui sont obligatoirement globales, correspondant aux conditions climatiques moyennes de pays très vastes, notamment U.S.A. (ECKENFELDER, GLOYNA *et al.*, 1958), Union Sud africaine (MARAIS et SHAW, 1961), Inde (MOHANRAO, 1973). Une échelle des valeurs correspondant à des températures variées (5^0 à 35 °C) a toutefois été fournie (DUARTE FILHO, 1968), d'après des mesures de HERMAN et GLOYNA (1958). La température du liquide est en effet le paramètre dont l'influence intègre le mieux celle des divers facteurs climatiques en jeu : énergie lumineuse et calorifique reçue du soleil, température de l'air, renouvellement de l'air, etc.

Devant l'impossibilité de procéder en France à la même étude statistique, il était souhaitable de mesurer du moins la constante K sur quelques installations situées dans un climat donné, et si possible au cours des différentes saisons.

Rappelons ici que les constantes établies à l'étranger correspondent aux conditions d'expériences suivantes.

La DBO_5 est mesurée sur échantillons bruts, c'est-à-dire sans séparation des algues.

MARAIS a toutefois mesuré une constante K d'après des échantillons ayant subi ce traitement — par filtration ou centrifugation — c'est-à-dire relatives, grosso-modo, à la pollution soluble, et a trouvé des valeurs plus élevées qu'en présence des algues.

Bien qu'elle ne soit pas dénuée d'intérêt, nous estimons qu'il s'agit là d'une constante nettement distincte, de caractère partiel et qui offre moins d'utilité pratique que la constante classique pour la conception des installations.

Les prélèvements sont effectués dans un seul bassin : soit premier bassin d'une série (bassin primaire), soit bassin unique constituant certaines petites installations.

Le milieu liquide est supposé homogène, c'est-à-dire que l'effluent entrant se répand instantanément et intégralement dans ce milieu. Les lois de dégradations y sont en effet différentes de celles observées dans un cours d'eau, où la concentration diminue progressivement dans l'espace.

Selon les auteurs, la loi hyperbolique de réaction ne serait correctement vérifiée que dans de telles conditions, et aucun mode de calcul ne permettrait actuellement de rendre compte du fonctionnement global d'une installation à plusieurs bassins en série. Nous pensons cependant plausible que l'allure du phénomène de dégradation dans une installation de ce type soit, en gros, analogue à celle d'un système de lagunage à bassin unique de même dimension totale. Il est donc opportun de rechercher si une équation de même forme, avec une constante de valeur différente qui serait une sorte de composante des constantes partielles par bassin, ne peut

être valable pour une série peu nombreuse, ce qui est le cas des installations dont nous disposons en France. Dans le cas d'un grand nombre de compartiments, il a été démontré, par l'expérience et par le calcul, que la loi de dégradation tend vers une forme exponentielle, correspondant au cas limite de l'auto-épuration d'un cours d'eau (STREETER et PHELPS, 1944).

Malgré la théorie de MARAIS, selon laquelle la loi ne s'appliquerait que dans le bassin primaire, d'autres chercheurs ont calculé des constantes correspondantes à des bassins secondaires et tertiaires (DUNCAN-MARA, 1974), et même à de petites séries entières.

La thèse de MARAIS impliquerait en effet une disparité entre les lois de dégradation des matières oxydables et celles de la décontamination ou de l'inactivation microbienne, à laquelle pourtant une formule de structure exactement identique est universellement appliquée.

Par ailleurs, des modèles mathématiques ont été établis, et expérimentalement étalonnés, pour traduire l'influence de la température sur la vitesse de réaction. La relation la plus généralement admise est de forme exponentielle : $K_T = a\theta^T$ où a est un coefficient numérique, T la température du milieu liquide, θ étant appelé coefficient de température et ne dépendant en principe que des caractéristiques de l'effluent admis dans les bassins. En prenant pour base la valeur de K à 20 °C, par exemple, la formule s'écrit :

$$K_T = K_{20} \cdot \theta^{T-20}.$$

MARAIS (1966) a obtenu, d'après des données de SUWANNAKARN et GLOYNA (1964), une valeur de 1,085 pour ce coefficient θ. ZANKER (1973) a indiqué 1,035 à 1,074.

Certes, de tels modèles ne peuvent être vérifiés rigoureusement qu'à l'aide de dispositifs de laboratoire, qui permettent de faire varier un seul facteur à la fois. Dans des expériences telles que celles décrites ci-après, réalisées sur une installation opérationnelle, il est difficile d'éliminer la variation simultanée d'autres facteurs au cours des saisons : par exemple, la durée réelle de séjour qui dépend des fluctuations du débit entrant.

Néanmoins, la stabilité de la constante de vitesse doit pouvoir être vérifiée à partir des résultats d'un certain nombre d'expériences sur des installations existantes. Il en est de même pour la corrélation existant entre coefficient de vitesse et température, en gardant à l'esprit que si les valeurs trouvées pour K sont en fait altérées par la variation de R, ce ne peut être que faiblement, compte tenu de l'équation théorique.

Sur le plan pratique, l'important est de connaître une valeur moyenne de K, à différentes saisons, ce qui permet au moins de prévoir les performances d'hiver ou d'été d'autres bassins situés dans des conditions analogues.

Enfin, le coefficient K universellement considéré est défini en fonction de concentrations de pollution, et en conséquence ne tient pas compte de l'effet des pertes d'eau durant le traitement. Or, ces pertes, dues à l'infiltration dans les fonds de bassins et surtout à l'évaporation, accroissent les teneurs finales en éléments polluants quels qu'ils soient. L'erreur sur la charge résiduelle, donc sur la vitesse de réduction, est d'autant plus élevée que la durée de séjour est plus longue, car les pertes sont alors relativement plus élevées.

Il en résulte que, parallèlement à l'évaluation des coefficients de vitesse classique, indispensables pour établir des comparaisons avec les valeurs obtenues à l'étranger, il serait nécessaire de chercher à utiliser le modèle cinétique pour définir et mesurer un coefficient homologue à partir de charges totales journalières

d'entrée et sortie, qui sont indépendantes des pertes (charge totale C d'un effluent = Concentration P x volume journalier V).

Le premier volet de l'étude, objet du présent mémoire, se limite à la pollution oxydable. Bien que le même modèle soit généralement considéré comme applicable à la destruction de la pollution bactérienne, les processus de dégradation des germes microbiens sont plus complexes et méritent d'être étudié spécialement. Il sera donc traité dans une suite au présent mémoire.

II. — Protocole expérimental, méthodes et matériel

Un protocole général a été établi pour les deux principales études de fonctionnement de bassins de stabilisation, réalisées en 1974 et 1975.

— La première en bassin de lagunage dit complet, c'est-à-dire de traitement d'un effluent brut, n'ayant subi aucune épuration primaire ni secondaire; il s'agit de bassins du Grau du Roi (Gard), alimentés par le réseau intercommunal d'eaux d'égoûts desservant cette commune, Port-Camargue, et de nombreux campings en saison estivale.

L'installation complète comporte quatre files de trois bassins en série d'une superficie totale de 20 ha, les files étant alimentées en parallèle par des ouvrages munis de vannes, et les bassins de chaque série communiquent entre eux par des buses situées aux angles opposés des bassins, de forme rectangulaire ou carrée. La hauteur d'eau y est de l'ordre de 1,10 m-1,20 m.

— La seconde étude, en lagunage dit tertiaire, les bassins recevant un effluent issu d'une station de traitement biologique secondaire. Les eaux résiduaires de Leucate (Aude) sont conduites à un chenal d'oxydation et de là dans une seule file de trois bassins en série, de forme carrée ou trapézoïde, où la hauteur d'eau est de l'ordre d'un mètre.

Les deux installations sont situées sous des conditions climatiques assez peu différentes (latitude = 43^0 environ), avec seulement moins de pluies et d'humidité et davantage de vent à Leucate qu'au Grau du Roi.

Les expériences, qui se sont étalées sur près d'un an et demi, soit en gros six saisons successives, ont consisté en un grand nombre de prélèvements périodiques d'échantillons d'eau et d'analyses chimiques et bactériologiques.

Les rapports d'étude principaux qui traitent du fonctionnement et des rendements d'épuration ont été diffusés par le Service Régional de l'Aménagement des Eaux du Languedoc-Roussillon (Ministère de l'Agriculture) (ANONYME, 1975; SAUZE, 1975). Ces documents fournissent l'ensemble des caractéristiques de conception et de fonctionnement des installations ainsi que les variations de débit et de composition de l'effluent traité, qui ne peuvent trouver place dans ce mémoire.

1. — *Prélèvements d'eau et analyses*

Les prélèvements d'eau ont été effectués en moyenne tous les quinze jours dans l'effluent brut, avant traitement et après passage dans les divers bassins.

L'effluent brut, dont la composition subit des variations journalières importantes, a fait l'objet de prélèvements continus pendant 24 heures, (échantillonneur continu du S.R.A.E. de fabrication artisanale) et constitution de six échantillons

moyens de 4 heures, les prélèvements sur le liquide pendant ou après lagunage étant seulement instantanés.

Les concentrations en demande d'oxygène (DBO_5 et DCO) ont été mesurées à divers stades du passage dans les bassins en série, en vue de calculer à la fois les coefficients de dégradation et les rendements d'épuration.

Le facteur polluant servant de critère à l'épuration étant traditionnellement la DBO_5, nous l'avons adopté par souci de comparabilité avec les résultats d'autres auteurs. Ceci malgré les réserves souvent formulées sur la valeur de ce critère, auquel on reproche d'une façon générale son imprécision, et en matière de lagunage l'erreur résultant de la part imputable à la présence de plancton — peu assimilable à une pollution — dans l'effluent traité.

Il sera également considéré, à titre de confirmation, les résultats de mesures de concentration en DCO.

Ces mesures de demande d'oxygène ont été effectuées sur échantillons bruts, sans décantation ni filtration préalable, les analyses étant réalisées conformément à la méthode normalisée (AFNOR T 90.103 et T 90.101).

Les températures de l'eau ont été mesurées à la verticale des points de prélèvements, au milieu de la tranche d'eau, et au moment de ces prélèvements, soit à heure fixe en fin de matinée.

Les débits moyens ont été établis à partir des diagrammes de deux débitmètres enregistreurs continus placés à l'entrée et à la sortie des installations.

2. — *Classement des résultats et calculs*

Les résultats d'analyse et les températures échelonnées le long du cycle annuel, ainsi que toutes les grandeurs qui en sont tirées par le calcul, ont été groupés de façon à obtenir des moyennes saisonnières; les périodes choisies sont aussi homogènes que possible à l'égard des variations saisonnières et des caractéristiques de l'effluent (volume et charge).

Les conditions atmosphériques au cours des diverses expériences ont été dans l'ensemble normales pour la région. Les températures de l'air, non mentionnées, ont été toutefois mesurées à chaque séance de prélèvement d'eau. Elles sont en corrélation pratiquement linéaire avec celle du liquide, dont elles ne diffèrent que de quelques degrés.

Les durées de séjour théoriques R ont été calculées à partir des débits mesurés par des débitmètres enregistreurs continus à l'entrée et à la sortie des séries de bassin.

Les coefficients de vitesse de réaction K′ et les rendements d'épuration r ont été calculés d'après les charges totales de l'effluent brut et d'effluent traité (sortie du troisième bassin), selon la formule $C = p.V$.

III. — Résultats

La totalité des résultats ne pouvant être publiée sous forme de tableaux chiffrés, il est cité à titre d'exemple ceux de deux séries d'essais en lagunage complet (tabl. 1) et de quelques séries en lagunage tertiaire (tabl. 2).

Les paramètres mesurés expérimentalement et donnés sous forme de moyennes

TABLEAU I

Bassins de stabilisation du Grau-du-Roi
Coefficients de vitesse de dégradation et rendements d'épuration

Période	Tm d^0c (⁰)	R (jours)	DBO_5 mg/l			DCO mg/l		Charge DBO_5 kg/j		K_1 (DBO_5)	K (DBO_5)	K′ (DCO)	K′ (DBO_5)	r (DBO_5) %
			P_0	P_1	P	P_0	P	C_0	C					
Printemps-Été 1969	20	25	260	170	84	415	260	—	—	0,10	0,08	0,025	—	68
Automne-Hiver 1969-70	10	40	160	137	53	—	—	—	—	0,11	0,05	—	—	67
Cycle annuel (moyenne)	12	32,5	210	103	68,5	—	—	—	—	0,105	0,065	—	—	67,5
Été-Automne 1974 . . (mai-nov.)	18	28	102	—	23	350	153	247	36	0,10	0,125	0,03	0,31	76
Hiver 1974-1975 . . . (nov.-mars)	8	65	130	50	38 (*)	384	214 (*)	—	—	0,13	0,037	0,01	—	71
Printemps 1975 . . . (mars-mai)	12	45	143	—	41	303	202	145	49	0,22	0,055	0,01	0,05	71,5
Été 1975 (mai-août)	20	16	217	155	48	408	273	1 143	155	0,11	0,22	0,03	0,04	86
Cycle annuel (moyenne) (mai 1974-avril 1975)	14	46	125	—	34	346	190	—	—	0,15	0,07	0,017	0,18	73,5

(*) D'après prélèvement dans les bassins terminaux à proximité de l'exutoire.

Tm : Température moyenne du milieu liquide au cours de la période.
R : Durée de séjour moyenne du liquide dans la série de bassins entière.
Po, P : Concentrations en DBO_5 ou DCO avant (effluent brut) et après traitement (sortie du dernier bassin).
P_1 : Concentrations en DBO_5 ou DCO pendant le traitement (sortie 1^er bassin).

K_1 : Constante de vitesse de dégradation dans les bassins primaires, d'ap. concent. en DBO_5.
K : Constante de vitesse de dégradation d'après les concentrations en DBO_5 ou DCO.
K′ : Constante de vitesse de dégradation d'après les charges totales en DBO_5.
r : rendement d'épuration p. 100 = $\frac{Po - P}{Po} \times 100$.

TABLEAU 2

Bassins de stabilisation tertiaire
Coefficients de vitesse de dégradation

Bassin (localité) période	Tm d°c	K_1 (DBO_5)	K (DBO_5)	K (DCO)
BISCAROSSE (*) (série 2 bassins) :				
Hiver : 1971-1972	11	0,20	0,14	—
Printemps-été : 1972	18	0,20	0,18	—
LEUCATE :				
Automne-Hiver : 1974-1975	10	0,18	0,06	0,012
Été : 1974.	18	0,15	—	—
MARSEILLAN :				
Été : 1973.	22	—	0,10	—

(*) A titre de référence; expériences réalisées par la Faculté de Pharmacie de Bordeaux, résultats communiqués par l'Agence de Bassin Adour-Garonne (Anonyme, 1973).

saisonnières (de 6 à 16 mesures selon les périodes) ou pour un cycle annuel, sont les suivants :

— facteurs essentiels de la biodégradation et du rendement de l'épuration, limités à 2 : température moyenne de l'eau et durée de séjour dans les bassins;
— concentrations en DBO_5 et DCO, avant et après traitement, ainsi que charge totale journalière;
— concentration en DBO_5 à la sortie du premier bassin, dit primaire, et constante partielle correspondante.

D'après ces paramètres fondamentaux, ont été calculées les constantes correspondant à chaque période :

— Constante K_1 de réduction de DBO_5, relative au traitement dans le bassin primaire;
— Constantes K globales de réduction de DBO_5 et DCO correspondent au traitement intégral (ensemble de la série);
— Constante K′ globale de réduction de DBO_5 d'après la charge totale;
— Taux ou rendement r de réduction de matières oxydables, correspondant au traitement intégral dans la série, donc à la durée de séjour totale R. Ce taux, qui n'est valable que pour une certaine durée de séjour dans le cas des bassins étudiés, est celui que l'on utilise en pratique pour apprécier les performances de l'installation.

La constance K′ en hiver n'a pu être établie, du fait que, pendant les mois très creux, le débit entrant étant trop faible pour compenser l'évaporation, le débit sortant est pratiquement nul, ce qui annule également la charge totale sortante; seules sont données les concentrations en demande d'oxygène d'après des prélèvements effectués non dans l'exutoire (buse d'évacuation des bassins terminaux), mais dans les bassins eux-mêmes (tabl. 1).

Constantes de vitesse de dégradation		K1 (1er bassin)	K′ (série de 3 bassins)
ÉTÉ-AUT. 1974	- - - - - - -	0,10	0,15
HIVER 1974-1975	———————	0,13	0,03
PRINTEMPS 1975	— · — ·	0,22	0,055
ÉTÉ 1975	— ··· —	0,11	0,22

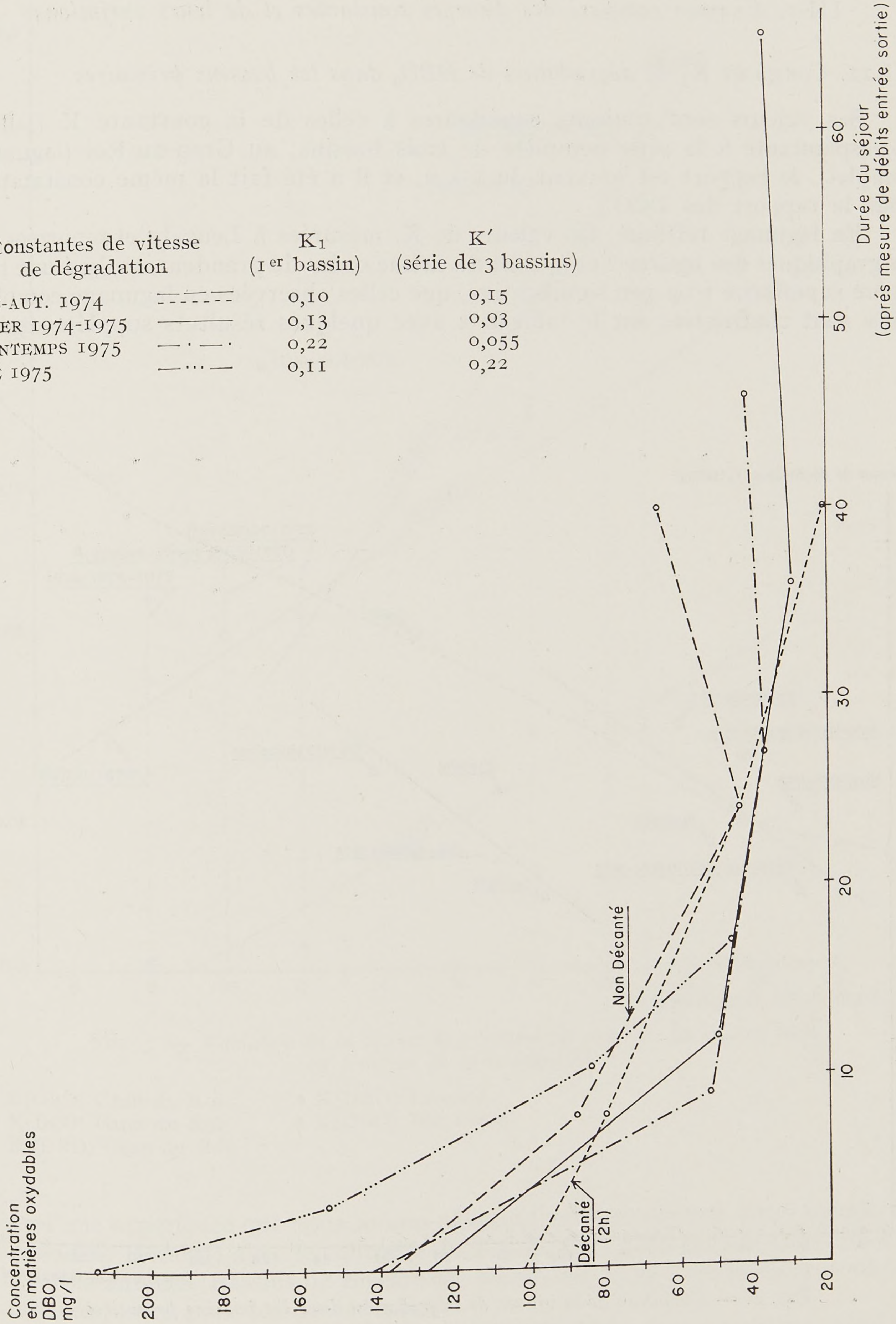


Fig. 1. — *Décroissance de la DBO_5 en fonction des durées de séjour. Grau-du-Roi,* 1974-1975.

III-1. *Examen comparé des diverses constantes et de leurs variations*

III-11. *Constante K_1 de dégradation de DBO_5 dans les bassins primaires*

Ses valeurs sont toujours supérieures à celles de la constante K (DBO_5) correspondante à la série complète de trois bassins; au Grau-du-Roi (lagunage complet), le rapport est souvent de 1 à 2, et il a été fait la même constatation pour le rapport des DCO.

En lagunage tertiaire, les valeurs de K, mesurées à Leucate et reportées sur les graphiques des figures 2 et 3, sont du même ordre de grandeur, malgré une très légère supériorité trop peu significative, que celles observées en lagunage complet. Elles sont confrontées sur le tableau 2 avec quelques résultats supplémentaires

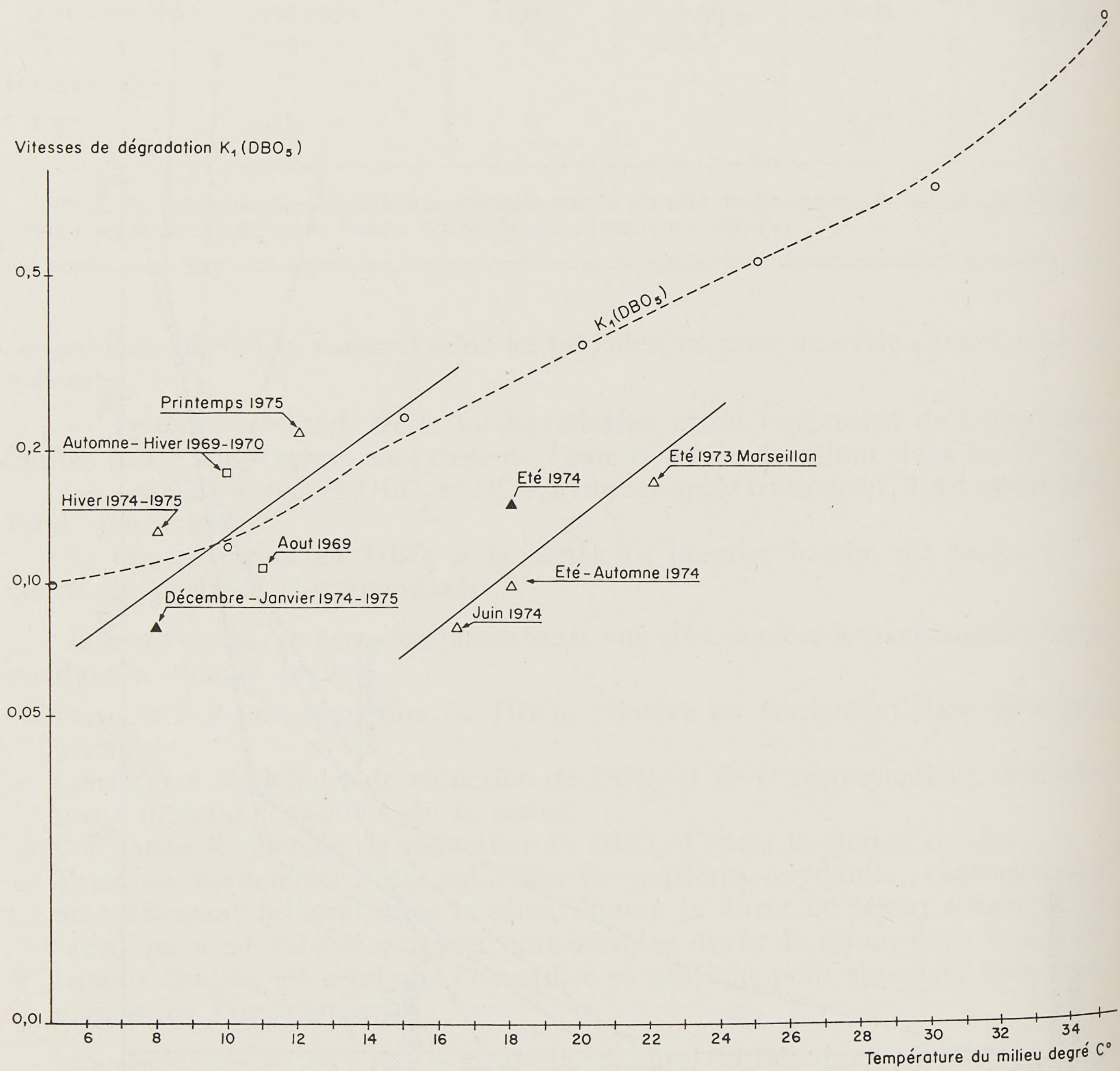


FIG. 2. — *Variation de la vitesse de dégradation dans les bassins primaires en fonction de la température.*

○ K_1 (DBO_5) courbe d'après échelle de Duarte Filho.
□ Grau du Roi 1969.
△ Grau du Roi 1974-75.
▲ Leucate.

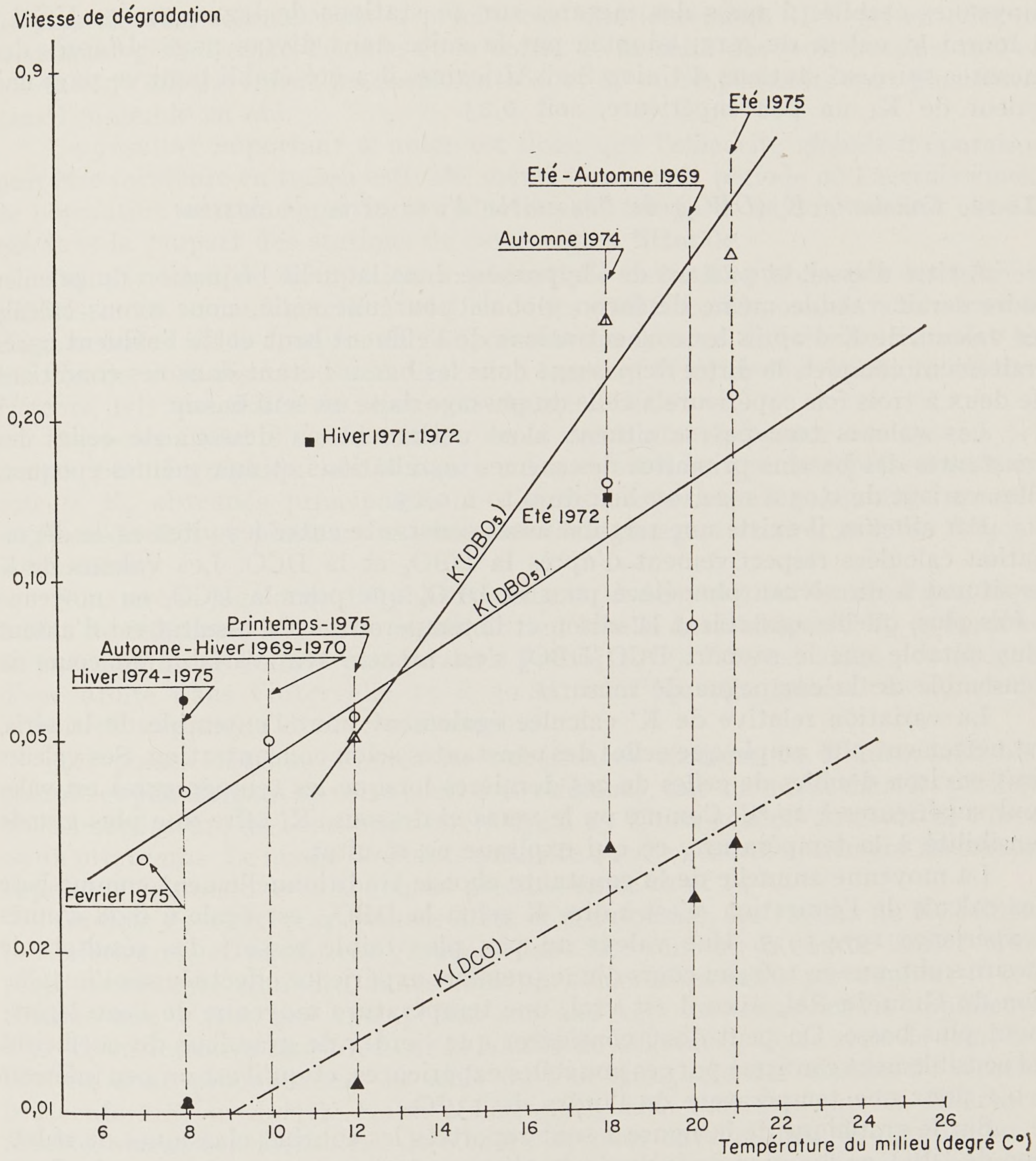


FIG. 3. — *Variation de la vitesse de dégradation dans les bassins en série en fonction de la température.*

○ K(DBO) Grau du Roi
▲ K(DCO) Grau du Roi
▲ K'(DBO) Grau du Roi

● K(DBO) Leucate
● K(DBO) Biscarosse

issus d'une expérience que nous avions effectuée en 1972 sur une autre installation (Marseillan, Hérault) avec le concours du B.C.E.O.M., ainsi qu'à des mesures dues à d'autres auteurs (Bassins de Biscarosse, Anonyme, 1973). Ces résultats sont tout à fait cohérents avec les précédents.

Les valeurs de K_1 les plus fréquentes aux températures courantes, ainsi que les valeurs moyennes d'après les mesures sur cycle d'un an, sont du même ordre de grandeur, soit 0,15 à 0,20, que les chiffres obtenus par les auteurs étrangers pour des températures équivalentes (12 à 14 °C). MARAIS (1961), utilisant les

moyennes établies d'après des mesures sur 40 stations de lagunage des U.S.A., a fourni la valeur de 0,17, adoptée par la suite dans divers pays. D'après des mesures sur neuf stations d'Union Sud-Africaine, il a été établi pour ce pays une valeur de K_1 un peu supérieure, soit 0,23.

III-12. *Constante K (DBO_5) de l'ensemble d'une série de bassins*

A titre d'essai, et partant de l'hypothèse dans laquelle l'équation du premier ordre serait valable même de façon globale pour une série, nous avons calculé les valeurs de K d'après les concentrations de l'effluent brut et de l'effluent après traitement complet, la durée de passage dans les bassins étant dans ces conditions de deux à trois fois supérieure à celle du passage dans un seul bassin.

Les valeurs trouvées se situent alors nettement en dessous de celles des constantes des bassins primaires des mêmes installations et aux mêmes époques; elles varient de 0,05 à 0,22, au lieu de 0,10 à 0,15.

Par ailleurs, il existe une relation assez constante entre les vitesses de dégradation calculées respectivement d'après la DBO_5 et la DCO. Les valeurs de K se situent à un niveau plus élevé pour la DBO_5 que pour la DCO, en moyenne 5 fois plus, quelles que soient la saison et la température. Ce résultat est d'autant plus notable que le rapport DCO/DBO_5 s'est montré très variable au cours de l'ensemble de la campagne de mesures.

La variation relative de K′ calculée également pour l'ensemble de la série, est nettement plus ample que celles des constantes selon concentration. Ses valeurs sont environ doubles de celles de ces dernières lorsque les températures estivales sont supérieures à 20 °C. Comme on le verra ci-dessous, K′ offre une plus grande sensibilité à la température, ce qui explique ce résultat.

La moyenne annuelle de la constante choisie traditionnellement comme base des calculs de l'épuration, c'est-à-dire K selon la DBO_5, est égale à 0,08 d'après l'expérience 1974-1975. Une valeur un peu plus faible ressort des résultats de mesures obtenus en 1969 au cours d'une première expérience effectuée sur l'installation du Grau-du-Roi, avec il est vrai, une température moyenne de l'eau légèrement plus basse. On peut donc considérer que l'ordre de grandeur du coefficient est sensiblement confirmé par ces nouvelles expériences, et qu'il est un peu inférieur à 0,1 pour une température de l'ordre de 13 °C.

Sur le graphique de la figure 1 sont reportées les courbes classiques de réduction de DBO_5 en fonction de la durée de séjour, relatives aux expériences du Grau-du-Roi qui ont fait l'objet du plus grand nombre de mesures bassin par bassin. Les valeurs des vitesses de réduction entre les points anguleux des courbes étant proportionnelles à la pente des droites qui les relie, le rapport entre les constantes globales, représentées par les droites (non tracées) reliant les points d'origine et d'extrémité de chaque courbe et les constantes K_1 relatives au bassin primaire est bien mis en évidence. On peut remarquer les formes hyperboliques des courbes, en particulier celle d'hiver et de printemps, qui paraissent présenter une asymptote horizontale commune correspondant à une DBO_5 de 20 mg/l environ.

Le léger relèvement des courbes en fin de traitement, bassins terminaux, est classique, et paraît dû à la présence des algues : comparer avec la fin plus plongeante de la courbe d'été obtenue avec des échantillons décantés.

Le rendement est dans l'ensemble un peu plus élevé en été, bien que les vitesses moyennes de réaction dans le bassin primaire aient été du même ordre qu'en hiver, plutôt inférieures même en raison de conditions particulières au cours des mois

les plus chauds, comme nous le préciserons ultérieurement. Il s'agit en effet du rendement global entre l'entrée et la sortie de la série des trois bassins, et l'on constate qu'effectivement les coefficients K et K′ correspondants sont plus élevés dans l'ensemble en été.

Un résultat important à noter est donc que l'efficacité globale d'épuration peut être meilleure en saison estivale, même pendant la période où l'accroissement de population entraîne une forte réduction du temps de séjour, comme c'est le cas dans la plupart des stations de cette région littorale.

Compte tenu de la relation exponentielle entre K établie par les auteurs précités, nous avons cherché à vérifier si les points correspondant aux séries de mesures faites à des époques de températures moyennes diverses se situaient sur une courbe, sous réserve d'une dispersion pouvant résulter des variations d'autres facteurs, tels que durée de séjour ou charge initiale.

Reprenons tout d'abord l'étude de la constante K_1 propre aux bassins primaires. Sur le graphique de la figure 2 sont portés les points représentatifs des valeurs K_1 obtenues principalement d'après l'expérience en lagunage complet au Grau-du-Roi et plusieurs expériences en lagunage tertiaire, celle de Leucate notamment.

Nous avons jugé utile d'établir également, et de porter sur le même graphique à titre de référence, la courbe résultant de l'échelle des valeurs de K_1 en fonction de la température donnée par DUARTE FILHO (1972). Elle est assez peu éloignée d'une droite dans l'intervalle 15 à 30 °C, où l'équation généralement admise $K = a \, . \, \theta^T$ s'applique donc correctement.

Les points obtenus d'après les expériences réalisées en France sont bien groupés et peu éloignés de cette courbe de référence, tout au moins dans les périodes où la température de l'eau était inférieure à 15 °C, en général au cours de l'hiver ou du printemps. Le nuage de points présente un axe général nettement ascendant, et presque confondu avec la courbe précitée entre 12 et 15 °C.

Au-delà de 15 °C (expériences d'été et d'automne), les valeurs de K_1 sont un peu inférieures, et paraissent groupées dans une zone où la courbe conserve une pente ascendante similaire, mais avec un « décrochement » par rapport à celle obtenue aux U.S.A. (en extrapolant son axe vers les températures supérieures à 30 °C, on retrouve sensiblement la courbe de référence). Cette zone de température est donc probablement la seule où l'on enregistre des vitesses de réaction peu conformes au modèle établi à l'étranger, sans toutefois que les différences absolues soient considérables : de 0,08 à 0,17 pour 20 °C au lieu de 0,30. La pente générale des courbes obtenues assimilées à des droites correspondent à une valeur de θ légèrement supérieure à 1.

Aucune différence apparente n'existe entre le lagunage complet et le lagunage tertiaire (Leucate, Marseillan, Biscarosse), sauf peut-être en été où le coefficient K_1 serait un peu plus élevé en tertiaire.

Sur le graphique de la figure 3 sont portées les courbes relatives aux constantes K globales.

Elles conduisent à diverses observations.

Les valeurs des vitesses de réaction tant en DBO_5 qu'en DCO sont cohérentes, et la dispersion autour de la courbe représentative n'est pas plus élevée que celle de la constante partielle des bassins primaires, et l'est même moins pour les basses températures (un seul point éloigné de la droite sur six).

Dans l'ensemble, les valeurs obtenues sont un peu plus faibles que celles citées par les quelques chercheurs qui ont calculé les constantes de cette nature.

SHELEF *et al.* (1974) en Israël ont indiqué pour une expérience d'un an sur

une série de cinq bassins un coefficient K global de 0,20, variant dans une faible mesure malgré une amplitude annuelle de température allant de 14 à 25 °C (bassins à très forte charge, dont les premiers sont entièrement anaérobies).

Enfin, MOHANRAO (1973) a adopté en Inde des valeurs de K (DBO_5) égales ou supérieures à 0,15 lorsque la température ne dépasse pas 15 °C pendant de longues périodes, ce qu'il indique être presque toujours le cas pour les régions situées au Nord de la latitude 30 °N.

La fonction exponentielle est bien vérifiée pour toutes les zones de température et la pente de la droite représentative est même sensiblement égale à celle de la constante K_1. On ne constate pas ici le « décrochement » du niveau de K (DBO_5) pendant la saison chaude comme cela se produisait pour la constante particulière aux premiers bassins.

Les valeurs de K′ (DBO_5) paraissent obéir à une loi semblable mais la croissance avec la température serait alors nettement plus forte, ce qui traduit l'amplitude élevée des variations constatées.

La droite relative à K (DCO) est également presque parallèle aux précédentes, mais les valeurs de cette constante sont nettement plus faibles que celles de K (DBO_5). Il est à noter que les mesures effectuées tant au Grau-du-Roi que dans d'autres stations ont toujours mis en évidence un rendement de DCO sensiblement plus faible. De même, on note une variation de même sens, sous l'influence de la température pour K et *r* relatifs à la DBO_5. Ces résultats sont logiques car, dans le cas de durées de séjour limitées, l'efficacité globale d'une installation, quel que soit le nombre de bassins, croît avec la vitesse de biodégradation de l'ensemble.

IV. — Discussion

IV-1. *Comparaison entre lagunage complet et lagunage tertiaire*

Aucune différence très significative n'a pu être décelée dans les résultats fournis par ces deux types de traitement, ni dans les vitesses de dégradation des bassins primaires ni dans celles des séries entières. Ceci tend à montrer que ces caractéristiques sont bien indépendantes des paramètres fondamentaux, soit durée de séjour, soit charge initiale. Ceux-ci sont en effet nettement plus élevés en lagunage complet qu'en tertiaire (ce qui est particulièrement le cas dans une installation telle que le Grau-du-Roi, qui traite un effluent brut n'ayant subi aucun dégrossissage primaire).

Les points correspondant à l'expérience sur les bassins tertiaires de Biscarosse, site de climat atlantique mais de latitude comparable à celle des bassins du Languedoc, montrent des vitesses assez élevées, notamment en hiver où la valeur de K (DBO_5) est très au-dessus de la courbe établie d'après nos propres expériences.

IV-2. *Comparaison entre constantes globales et partielles Influence de la température*

Les courbes des figures 2 et 3 montrent que l'échelle des valeurs de K_1 établie aux U.S.A. et utilisée même dans d'autres pays s'applique correctement dans le Languedoc, pendant les périodes hivernales tout au moins. Le léger décalage

vers des valeurs inférieures, observé lorsque la température de réaction dépasse 15 à 16 °C, semble traduire un changement d'écologie et d'évolution biochimique du milieu.

Cette hypothèse est renforcée par les constatations effectuées fréquemment tant en France que dans d'autres pays sur le fonctionnement des bassins primaires en été, surtout en lagunage complet : tendance à l'anaérobiose (changements de couleur, odeurs, dégagements gazeux) dès que la température dépasse une certaine valeur, qui varie avec diverses autres conditions. On peut penser que l'accumulation de sédiments, due à une décantation toujours importante dans les bassins primaires, favorise le phénomène.

Ces anomalies de fonctionnement, qui en fait agissent peu sur le rendement d'épuration sauf si elles se prolongent, sont il est vrai accentuées si la charge unitaire admise dans le premier bassin est trop élevée : ce peut être le cas pour l'installation du Grau-du-Roi, où la surface des bassins primaires a été calculée un peu faible. Ceux de Leucate, par exemple, assurent déjà une vitesse de réaction plus proche de la courbe de référence.

Nous estimons probable d'ailleurs que, vers les fortes températures, les valeurs de K_1 dans le Languedoc se rapprochent progressivement de celles de cette courbe, bien que nous n'ayons pu disposer de résultats pour des températures moyennes saisonnières supérieures à 22 °C, qui auraient permis d'étayer cette hypothèse. On sait du moins que vers 30 °C la microflore interne se modifie, beaucoup d'algues meurent, et que les processus biochimiques deviennent très différents, l'effet sur le rendement d'épuration pouvant être finalement soit favorable (s'il y a anaérobiose complète), soit défavorable.

Bien que l'allure des phénomènes propres aux bassins primaires soit importante, il est nécessaire surtout d'examiner ce qui se passe globalement entre l'entrée et la sortie des installations de façon à établir des bases pour le calcul de leur capacité totale.

En concentration de DBO_5, les valeurs de 0,03 à 0,22 que nous avons pu relever correspondent à une gamme de régions tempérées. Seules les installations situées dans des zones à hivers froids telles que l'est et le nord de la France ne pourront en bénéficier qu'en extrapolant les courbes vers les températures inférieures à 8 °C. Il sera utile de tenir compte de celle relative à la DCO, dont les points sont certes moins nombreux mais moins dispersés, sans doute en raison de la plus grande précision de la mesure.

La valeur plus faible, pour une température donnée, d'une constante calculée globalement sur une série, par rapport à celle qui correspond à des vitesses établies individuellement par bassins, peut s'interpréter notamment par le phénomène de croissance progressive du phytoplancton, qui intervient dans l'évaluation des DBO_5. En effet, la présence d'algues accroît la DBO_5 des échantillons analysés, ce qui contrecarre le phénomène de réduction due à l'épuration.

Par ailleurs, selon certains auteurs, l'influence de la durée de séjour pourrait exister pour les bassins situés à l'aval du bassin primaire.

Il est donc certain que K est une vitesse différente des vitesses partielles, et le calcul montre qu'elle peut effectivement n'être pas indépendante de la durée. Elle est donc plus spécifique. et les valeurs trouvées dans les expériences relatées ne sont donc pas forcément applicables comme K_1 à une station ni à une période de fonctionnement quelconque. On observe toutefois que les bassins de stabilisation existant ont des caractéristiques de conception et de fonctionnement suffisamment similaires pour que la notion de vitesse globale soit utilisable avec une approximation convenable. La valeur relative de la constante globale n'est d'ail-

leurs pas primordiale; l'important est qu'elle mérite d'être considérée en priorité parce que calculable plus rapidement, surtout lorsque les séries comportent plus de deux ou trois bassins, et que son coefficient de correction de température est valable dans une plage thermique plus étalée. Selon la théorie de base, le pourcentage de réduction de la concentration initiale devrait être calculée en fonction de constantes partielles propres à chaque bassin, selon la formule

$$\frac{p}{p_0} = \frac{(1 + k1R1)(1 + k2R2)(1 + \ldots) \ldots (1 + k_n R_n)}{1}$$

Cependant l'hypothèse de départ de cette théorie, soit l'homogénéisation instantanée de la masse liquide, n'est pas forcément vérifiée dans tous les bassins. Elle est plus plausible dans le cas de la réduction des germes bactériens, qui se reproduisent et se propagent très rapidement.

Si, par ailleurs, l'on tient compte des courbes de biodégradation obtenues d'après nos mesures (fig. 1), on constate que l'allure de la réaction dans la série de trois bassins étudiée est de forme analogue à celles établies par tous les auteurs ayant expérimenté sur des bassins uniques. Ces résultats confirment l'hypothèse déjà formulée, à savoir que la vitesse de réaction dans une série est une enveloppe des vitesses partielle dans chacun des bassins, et reste pratiquement peu dépendante de la durée de séjour totale. En fait, les courbes de décroissance des polluants qui ont été établies pour l'ensemble d'une série sont généralement en légères « dents de scie » du fait des passages d'un bassin au suivant. Mais leur allure générale est toujours voisine d'une hyperbole, R étant alors la variable.

La forme exponentielle des fonctions $K(t)$ se trouve donc vérifiée dans le cas des bassins multiples.

Les courbes de la figure 2 nous ont montré que la valeur trouvée pour le coefficient de correction de température, d'après la pente des droites représentatives de $K_1(DBO_5)$, est peu différente de celle établie par GLOYNA (6) pour les bassins primaires : $\theta = 1{,}085$ qui semble assez indépendante du climat. Cette valeur du coefficient θ, qui est sans doute un invariant en théorie, paraît avoir été considérée comme une norme et adoptée pour les projets d'installation dans plusieurs régions du monde. Le calcul à partir des résultats de nos expériences conduit à proposer une valeur un peu supérieure, soit 1,114, applicable à l'intérieur de chacun des intervalles 5-15 °C et 15-30 °C.

Le coefficient est le même pour $K(DBO_5)$ et pour $K(DCO)$ la différence des pentes n'étant pas significative.

Ceci permet d'écrire les équations utilisables pour prévoir des vitesses de dégradation sous le climat considéré, et pour une température quelconque de l'intervalle.

— *Bassins primaires :*

On peut prendre comme base la vitesse à 15 °C, dont la valeur 0,25 lue sur notre courbe coïncide sensiblement avec celle de la courbe de référence. On obtient :

$$\frac{K_1(15)}{K_1(T)} = (1{,}114)^{T-15} \quad \text{ou} \quad K_1(T) = \frac{0{,}25}{(1{,}114)^{T-15}}$$

équation de la droite $K_1 = 0{,}035\ (1{,}114)^T$.

Exemple de calcul :

$$\text{pour } T = 10^0,\ K_1 = \frac{(1{,}114)^5}{0{,}25} = 0{,}13; \qquad \text{pour } T = 15^0,\ K_1 = 0{,}25.$$

Lorsque la température est supérieure à 15 °C et que le processus de réaction tend vers l'anaérobiose, c'est la courbe inférieure qui doit être considérée

$$\frac{K_1(T)}{K_1(15)} = (1{,}114)^{T-15}$$

équation de la droite $K_1(T) = 0{,}07(1{,}114)^{T-15}$.

— *Séries de bassins*

Pour une série (comportant un petit nombre de bassins), l'équation de la droite K_{DBO_5} (T) est : $K = 0{,}085\ (1{,}114)^T$.

Exemple : pour T = 10, $K_{10} = 0{,}046$.

Les valeurs de K sont en moyenne de 70 p. 100 inférieures à celles de K^3, pour une même température.

IV-3. *Vitesse de dégradation des charges totales*

La prise en considération des charges totales n'est évidemment valable que dans l'hypothèse ou les pertes par infiltration capables d'entraîner une part de charge polluante sont négligeables, ce qui est le cas le plus général.

La constante K′ obtenue à partir de la charge totale apparaît dès lors comme plus réaliste que celles de type K, et peut conduire à des calculs plus exacts des rendements prévisibles, surtout en été et dans les régions chaudes ou à vents forts. Elle exige certes la connaissance des débits d'entrée et du coefficient d'évaporation, données qui sont de toute façon nécessaires pour calculer des bassins.

La courbe K′ (DBO_5) tend à mettre en évidence une sensibilité de cette constante à la température plus forte que dans le cas de K (DBO_5), ce qui peut s'expliquer par l'influence de l'évaporation intense au cours des périodes chaudes.

Toutefois cette courbe, qui n'est définie que par quelques points, ne représente qu'un dégrossissage et sa fiabilité est insuffisante pour énoncer une loi précise de variation. Des mesures supplémentaires devront être opérées à cet effet.

Il est à noter que le principe et la définition de cette constante sont tout aussi valables pour les vitesses partielles relatives à chaque bassin, dont on peut connaître la charge d'entrée et calculer celle de sortie de proche en proche à partir de celle de l'effluent brut. Ces données peuvent servir à une approche plus précise du calcul individuel des bassins d'une même série.

IV-4. *Validité et précision des résultats*

La dispersion relative des résultats obtenus par les auteurs qui ont travaillé sur ce sujet, même dans des pays de climat comparable, montre que l'on ne peut espérer déterminer les vitesses de dégradation autrement que sous forme d'une fourchette, pour une température de réaction donnée. Ce qui se traduirait sur les graphiques par des « bandes » encadrant les valeurs expérimentales de K et définies par chacune des droites-types, assorties d'un certain écart dont nous estimons l'amplitude à + 15 p. 100. Pour une température de 13 °C, par exemple, la valeur de K_1 lue sur la droite est d'environ 0,20, sa valeur probable se situe donc entre 0,17 et 0,23.

Le nombre des installations dont nous avons pu mesurer les performances est certes inférieur à celui de certaines enquêtes expérimentales réalisées notamment aux U.S.A., mais les valeurs relativement bien groupées obtenues dans le Languedoc permettent de prévoir que celles issues d'expériences futures sous le même climat, et peut-être même sous d'autres climats de France, se situeront dans la même bande.

D'un autre côté, les coefficients K mesurés dans chacune de ces installations, principalement celle du Grau-du-Roi, sont fondés sur des séries continues de prélèvements réalisés au cours d'une année ou davantage, et sont donc plus fiables que ceux obtenus par la plupart des chercheurs avec quelques sondages isolés.

Quoi qu'il en soit, il est admis en général que les performances des stations d'épuration utilisant un procédé de type spécifiquement biologique et écologique tel que le lagunage ne peuvent être calculées avec une précision supérieure à 20 ou 25 p. 100, bien d'autres paramètres que la vitesse de réaction venant ajouter au calcul leur coefficient d'incertitude.

V. — Complément de recherches ultérieures

Comme il est dit ci-dessus, il sera en premier lieu indispensable de répéter ces expériences dans des conditions quelque peu différentes : effluents urbains d'autres communes possédant des bassins de stabilisation, situés si possible sous des climats différents, plus septentrionaux notamment; certains effluents industriels d'autre part.

Les bassins tertiaires, sur lesquels on ne possède encore que des données insuffisamment certaines sous l'angle de l'efficacité de dégradation des matières oxydables, devront faire l'objet d'expériences complémentaires. Ceci sera facilité par le fait qu'un grand nombre d'installations de ce type sont en cours de construction ou en projet.

D'autres critères d'importance notoire pour l'estimation des qualités d'épuration des effluents urbains, tels que les teneurs en bactéries fécales et en germes pathogènes, sont soumis à des lois de biodégradation homologues de celles des matières oxydables. L'interprétation des résultats de nombreuses mesures effectuées dans le cadre des expériences précitées sur le lagunage permettra d'établir des modèles mathématiques traduisant ces lois.

VI. — Conclusions

Sous réserve de confirmation par des recherches complémentaires (cf. § V), les principaux points acquis peuvent être énumérés comme suit.

1° Le modèle cinétique exprimant la dégradation des matières oxydables dans les eaux résiduaires, appliqué à l'épuration par lagunage des effluents domestiques et établi en principe pour un bassin unique où séjourne un milieu homogène, est relativement bien vérifié pour l'effluent d'un bassin primaire. Bien qu'en théorie le coefficient de vitesse ne soit constant que dans cette hypothèse, le modèle s'avère applicable avec une précision suffisante pour l'effluent traité par passage successif dans les files de bassins étudiées fonctionnant en série. La constante ciné-

tique K a toutefois une valeur inférieure à celle qu'elle prend dans le cas du bassin unique au bout du même temps. En outre, elle ne doit être utilisée qu'avec une certaine prudence pour le calcul dimensionnel d'une station quelconque.

2° Le modèle cinétique paraît valable aussi bien pour un effluent en traitement tertiaire que pour un effluent brut, ce qui permet de vérifier que le coefficient définissant la vitesse globale de dégradation est bien une constante vis-à-vis de la concentration de l'effluent ou de la charge admise en tête du bassin primaire.

Effectivement, la constante de cette caractéristique par rapport à divers paramètres des processus de dégradation, en particulier la durée de séjour, a pu être par ailleurs mise en évidence en étudiant sa variation avec la température de réaction, seul facteur dont elle dépend selon la théorie, mis à part la nature et la composition de l'effluent. Une loi de variation exponentielle a été observée pour les constantes relatives aux critères de pollution habituels DBO_5 et DCO. Des recherches sont en cours actuellement pour transposer ces résultats au test des bactéries de contamination fécale.

3° Des mesures qui ont été cependant effectuées parallèlement pour étudier les vitesses de dégradation dans le bassin primaire de plusieurs séries de trois bassins, il résulte que les valeurs du coefficient K_1 correspondant à ce cas sont comparables à celles établies dans d'autres pays, notamment aux U.S.A. et en Afrique du Sud, bien qu'un peu inférieures lorsque la température de réaction dépasse 15 °C environ. En fait les valeurs obtenues pour des températures supérieures se situent sur une autre courbe de variation de K_1 avec ce facteur, traduisant un processus d'épuration différent dans le bassin, dont le milieu tend vers l'anaérobiose.

Reçu pour publication en décembre 1976.

Remerciements

Nous tenons à remercier les Services du Ministère de la Qualité de la Vie et de l'Environnement qui ont permis le financement des études de fonctionnement des bassins de stabilisation (crédits FIANE délégués au S.R.A.E. du Languedoc-Roussillon); le B.C.E.O.M., qui a réalisé l'étude de l'installation de Leucate, l'Institut Bouisson-Bertrand de Montpellier et le Laboratoire Municipal de Nîmes, qui ont effectué les analyses d'eau.

Summary

Study of the degradation speed coefficient as a characteristic of the lagooned waste water evolution.

Regular measures of the organic matter elimination in several lagoonage installations in the Languedoc during the annual operating cycles allowed us to standardize, under the local conditions, a kinetic model where the regression speed constant DBO_5 is involved during the treatment.

The validity of the model established by different countries under different climatic conditions has been controlled concerning the first basin of a series as well as the 3 basins of each series. The result leads to the determination of the values of the constant K_1 related to the primary basins, and then to the definition of a global constant K, which can rapidly provide an approximate value of the total basin surface necessary for the treatment.

The values of the constant K are then referred to the average medium temperature of the respective periods. This leads to the adjustment of an exponential-type model of temperature correction. Within a determined temperature level the representative curve keeps close to the

similar curve established according to another model. At the same temperature the reaction speeds in the complete lagoonage basins prove to be practically identical with those of tertiary lagoons.

A prospective research program aiming at extending the results to different climatic conditions is proposed.

Références bibliographiques

ANONYME, 1973. Fonctionnement d'un bassin de stabilisation (Biscarosse). Données de l'Agence de Bassin Adour-Garonne.

ANONYME, 1975. Étude des conditions de fonctionnement des bassins de stabilisation de Leucate. (S.R.A.E. du Languedoc-Roussillon, Ministère de l'Agriculture, Montpellier; B.C.E.O.M.)

DUARTE FILHO I., 1972. Diseno de Lagunas de stabilization. *Rapports de l'Université de la Havane, technologie,* série 10, (11), 37 p.

DUNCAN MARA D., 1975. Proposed design for oxydation ponds in hot climates. *J. Environ Eng. Div.*, EE 2, 296-300.

ECK H. VAN., 1960. Theory of stabilization ponds, and their implications on their design and operation. Proceeding of specialist meeting on water treatment. Pretoria. 279-295. Commission for Technical Cooperation in Agrica, London (England).

ECKENFELDER W. W. Jr., O'CONNOR D. J., 1961. *Biological waste treatment.* Pergamon Press New-York.

GLOYNA E. F., 1972. Bassins de stabilisation des eaux usées. *Organisation mondiale de la Santé.* Genève.

HERMAN E. R., GLOYNA E. F., 1958. Waste stabilization ponds. III. Formula of design equations. *Sewage Wastes,* **30** (511), 646, 963.

MARAIS C. R., SHAW V. A., 1961. A rational theory for the design of stabilization ponds in Central and South Africa. *Civil Eng. South Agrica.,* **3** (11), 1-20.

MOHANRAO G. J., 1973. *Waste water and refuse treatment and disposal in India.* Environmental Healt Engineering in hot climates and developping Countries. *J. Pickford,* New-Delhi.

OSWALD W. J., 1963. Fondamental factors in waste stabilization ponds design. *Adv. biol. waste treatments.* Oxford, Pergamon Press, 357-393.

PHELPS E. B., 1944. *Stream sanitation.* John Wiley (New-York).

SAUZE F., 1973. Étude du pouvoir épurateur dans les étangs de stabilisation d'eaux usées. *Tribune Cebedeau,* **353**, 161-178.

SAUZE F., 1975. Étude du fonctionnement des bassins de stabilisation du Grau-du-Roi (S.R.A.E du Languedoc-Roussillon, Ministère de l'Agriculture, Montpellier).

SHELEF G., WACHS A. M., ZOREF A., 1974. *Aging of stabilization ponds in series.* 1th Intern. Conference on Water Pollution Research. Pergamon Press. London.

ZANKER A., 1973. Determination of stabilization pond retention times. *Deeds Data,* (WPCF) Octobre, 2-7.

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (1), 59-77.

Stockage d'aliments composés pour rats et visons après addition d'agents conservateurs Evolution microbiologique

B. CAHAGNIER, J. P. MELCION, Cuc thi N'GUYEN, Jeanne POISSON* et J. ROUGEOT**

avec la collaboration technique de C. DESSERME

Laboratoire de biophysique des aliments et de technologie des aliments pour animaux, Centre de Recherches Agro-alimentaires, I.N.R.A., Chemin de la Géraudière, 44072 Nantes Cedex

**Laboratoire de Recherches Pathologie végétale, I.N.R.A., I.N.A., 16, rue Claude-Bernard, 75231 Paris Cedex 05*

***Laboratoire des pelages, toisons et fourrures, Centre national de Recherches zootechniques, I.N.R.A., 78350 Jouy-en-Josas*

Résumé

Les aliments humides pour petits animaux — agglomérés pour rats, pâtées pour visons — sont de conservation difficile.

Ainsi, les agglomérés pour rats ont fréquemment une teneur en eau (19 %) telle qu'ils risquent de devenir rapidement le siège d'une prolifération fongique. Dans les pâtées pour visons dont les teneurs en eau sont de l'ordre de 50-55 p. 100, les germes bactériens et fongiques se multiplient activement. L'addition d'acide sorbique, de sorbate de potassium, d'acide propionique et de propionate de sodium : conservateurs antimicrobiens et non toxiques pour les animaux à sang chaud, est envisagée pour pallier ces inconvénients. Afin de juger de l'action et de l'efficacité du procédé, le présent travail porte sur le comportement de la microflore des agglomérés et de pâtées témoins ou additionnées d'agent(s) de conservation.

L'acide sorbique exerce une action dépressive sur la population microbienne des agglomérés dès le début du traitement : cette action est plus marquée vis-à-vis des bactéries et notamment des bactéries non sporulées, que des moisissures; parmi ces dernières, les *Mucor* sont plus sensibles que les *Penicillium* et les *Aspergillus*. La durée de l'effet dépressif a été déterminée en fonction de la dose d'acide sorbique utilisée. Seules, les moisissures se sont développées sur les agglomérés. A partir des courbes d'évolution du niveau de pollution, il a été possible d'ébaucher un diagramme isotherme (23 °C) de conservation indiquant la dose d'acide sorbique recommandée pour obtenir la durée de conservation souhaitée.

Par rapport à l'acide sorbique, le sorbate de potassium et le propionate de sodium sont plus efficaces dans les conditions de nos essais. L'action antimicrobienne de l'acide sorbique est renforcée par l'acide propionique qui agit en synergie.

Dans le cas des pâtées pour visons, l'acide propionique (1 %), plus que l'acide sorbique,

freine la multiplication des bactéries autres que les lactobacilles. Tous les conservateurs abaissent la teneur des pâtées en germes de moisissures et la maintiennent à un bas niveau. Parallèlement, l'acide propionique semble jouer un rôle favorable sur la consommation d'aliment par le vison.

Mots clés : *aliments composés — microbiologie — conservation.*

Introduction

Lors du stockage, les aliments composés pour animaux sont exposés à des dégradations d'origine physique, chimique, mais aussi biologique : les microorganismes jouent à cet égard, un rôle important, à côté des rongeurs, des insectes et des acariens. Lorsque, pour des raisons technologiques ou économiques, il n'est pas possible de conserver de produit fini dans des conditions qui le mettent à l'abri d'un développement microbien, les fabricants peuvent recourir à des « conservateurs » antimicrobiens. Ces conservateurs doivent avoir un caractère d'innocuité totale pour l'animal auquel est destiné l'aliment, sans nuire à l'appétence de celui-ci. Les acides sorbique et propionique, ainsi que certains de leurs sels répondent à de telles exigences.

L'acide sorbique et le sorbate de potassium sont employés en alimentation humaine depuis de nombreuses années. Leur coût assez élevé en limite les possibilités d'emploi à des aliments composés eux-mêmes onéreux; de ce fait, les documents relatifs à la stabilisation microbiologique d'aliments pour animaux sont peu nombreux : LUCK *et al.*, (1972) observent qu'une farine pour porc charcutier ayant une teneur en eau de 14,7 p. 100 et contenant 0,05 p. 100 d'acide sorbique, se conserve correctement pendant un mois alors que le lot témoin est visiblement moisi à partir du vingtième jour. De même, des résultats satisfaisants sont obtenus avec des aliments pour pondeuses.

Les propionates de sodium et de calcium sont employés à l'étranger depuis longtemps, en alimentation humaine, plus particulièrement en boulangerie-pâtisserie et fromagerie. Depuis 1960 le propionate de sodium est incorporé aux U.S.A. dans les aliments pour animaux en tant que produit antifongique. Mais ce n'est que depuis 1970, que l'acide propionique est autorisé en France à la dose de 3 p. 100 pour la conservation des céréales destinées à l'alimentation animale. Nombre d'essais en ont montré l'effet favorable sur la qualité des ensilages de maïs grain humide (DUMAY *et al.*, 1972), sans altération notable de l'ingestibilité et de la valeur nutritive des régimes à base de céréales traitées pour les porcs (YOUNG *et al.*, 1970 — FÉVRIER *et al.*, 1972) et les ruminants (JONES *et al.*, 1970 — LELONG et MOAL, 1973).

Parmi les aliments composés pour petits animaux, l'aliment aggloméré pour rats et les pâtées pour visons sont caractérisés par des teneurs en eau élevées. En effet, pour des raisons technologiques, certains aliments expérimentaux pour rats de laboratoire doivent être agglomérés à l'aide de fortes quantités d'eau, en vue d'atteindre une cohésion acceptable. Ils sont alors stockés à une humidité voisine de 19 p. 100, favorable au développement des moisissures. Pour le vison, l'aliment encore fréquemment distribué en pâtée renferme plus de 50 p. 100 d'eau; il est, de ce fait, et surtout en période estivale, le siège d'une multiplication rapide des bactéries et des moisissures.

Pour réduire ces altérations, l'addition d'acide sorbique à ces deux types

d'aliments est envisagée. C'est pourquoi nous avons entrepris une première étude pour suivre le devenir des populations microbiennes d'aliments pour rats et de pâtées pour visons, traités par cet acide ou son sel de potassium. Des essais parallèles ont également été poursuivis avec l'acide propionique et son sel de sodium. L'acide propionique est un conservateur moins coûteux, que l'acide sorbique et son odeur est plus prononcée. Enfin, des mélanges d'acide sorbique et propionique ont également été étudiés.

Matériel et méthodes

I. — *Fabrication et conservation des aliments*

a) *Aliment pour rats de laboratoire*

Les aliments agglomérés pour rats se présentent sous forme de cylindres de 16 mm de diamètre; il contiennent 70 p. 100 de blé, 4 p. 100 de son, 12 p. 100 de farine de poisson, complétés par levure, huile de maïs, substances minérales et vitaminiques. Suivant les fabrications, la teneur en eau des agglomérés est voisine de 18,5 à 19 p. 100 de la substance humide (sh) soit 22,7 à 23,4 p. 100 de la substance sèche.

Après broyage et pesée des composants, l'aliment est homogénéisé à l'aide d'un mélangeur Hobart à mouvement planétaire puis aggloméré sur une presse Templewood (5 CV), munie d'une filière à perforations de 16 mm de diamètre et 80 mm de longueur. Le refroidissement est effectué à l'air libre. Il est fabriqué cinq kilos d'aliment par traitement. L'acide sorbique (AS) est incorporé au complément minéral et vitaminique par pré-mélanges successifs à raison de 0,05 — 0,5 — 1 — 3 — 5 — 7 p. 100 du poids de l'aliment humide, le sorbate de potassium (SK) à raison de 0,67 et 4,2 p. 100, valeurs correspondant à 0,5 et 3 p. 100 d'acide sorbique, et le propionate de sodium (PNa) aux taux de 0,6 ou 1,2 p. 100. L'acide propionique (AP) est pulvérisé directement sur les agglomérés, homogénéisés ensuite dans un mélangeur cubique pendant 20 min.

Les agglomérés sont stockés soit en bocaux, soit dans des sacs en plastique. Dans le premier cas, pour chaque essai, 0,9 kg sont répartis dans 12 sachets en tulle de nylon (soit environ 0,150 kg par sachet); ces derniers sont suspendus dans des enceintes (bocaux en verre) d'une capacité de 10 l, fermées de façon non étanche. La température des enceintes est de 23 ^{0}C $\pm$ 1. L'humidité relative de l'atmosphère y est maintenue constante par la mise en équilibre hydrique avec une solution saturée de KBr qui réalise une humidité relative de 85 p. 100; la teneur en eau correspondante des aliments est de 19 p. 100 (sh). Dans le deuxième cas, pour chaque essai, les agglomérés sont répartis à raison de 150 g dans des sachets en matière plastique, fermés de telle sorte que le volume d'air intersticiel dans le sachet soit de 1 170 ml. Les sachets remplis et fermés sont stockés à 23 ^{0}C + 1.

b) *Pâtées pour visons*

Pour les visons, les essais portent d'une part sur un aliment commercial, et d'autre part, sur un aliment expérimental renfermant 20 p. 100 d'avoine décortiquée, 33 p. 100 de farine de poisson, 11 p. 100 de pomme de terre déshydratée,

16 p. 100 de suif et de saindoux, de petites quantités d'autres farines protéiques (germe de blé, sang, levure, lin, luzerne déshydratée) et de C.M.V. (complément minéral et vitaminique).

Les conservateurs sont ajoutés :

— soit directement dans l'aliment commercial

AS : 0,5 ou 1,6 p. 100 du produit brut
SK : 0,7 ou 1,3 p. 100
AP : 0,5 ou 1 p. 100
PNa : 1,3 ou 2 p. 100

— soit par pré-mélanges successifs dans le cas de l'aliment expérimental (AS : 0,5 ou 1,6 p. 100; AP : 1 p. 100).

Une pâtée ayant une teneur en eau de 54 p. 100 (sh) est préparée à partir de chacun de ces aliments, divisée en fractions conservées, sur tamis en polyamide à l'intérieur d'une enceinte thermo- et hydrorégulée (température : 20 °C ± 1, humidité relative : 90 %). Des fractions sont prélevées au début de l'essai et après 2 — 6 — 9 et 10 jours pour déterminer les teneurs en eau, et dénombrer les bactéries, les levures et les moisissures.

Un essai d'appétence est mené parallèlement sur trois groupes de visons mâles Dark. Chaque groupe de quinze animaux reçoit respectivement sous forme de pâtée à 56 p. 100 d'eau (sh), 200 g/j et par animal d'un aliment commercial, seul ou avec 0,5 p. 100 d'acide sorbique ou 1 p. 100 d'acide propionique. Les refus sont pesés quotidiennement pendant 13 jours (21 mai au 2 juin 75).

2. — *Méthodes d'analyses*

a) *Détermination de la teneur en eau*

Le dosage est effectué sur 6 g de granulés broyés ou sur 10 g de pâtée homogénéisée, par étuvage à 130 °C jusqu'à masse constante (8 à 10 h).

b) *Dénombrement des micro-organismes*

Le dénombrement des micro-organismes est effectué par la méthode classique des dilutions décimales et ensemencements sur milieux de culture en boîtes de Petri, après mise en suspension du produit à analyser dans un diluant stérile (suspension mère).

c) *Préparation de la suspension-mère*

En l'absence de méthode de référence, il a été nécessaire de mettre au point un mode de préparation de la « suspension mère » adapté au produit à analyser.

Agglomérés pour Rat

La méthode retenue est la suivante : environ 150 g de granulés sont pesés exactement à 0,1 g près et versés aseptiquement dans le bol d'un homogénéiseur mécanique « Waring Blendor » en acier inoxydable de 1 l, avec 400 ml d'un diluant

stérile (Bacto-peptone 1 g, NaCl 1 g, Tween 80 0,033 g, eau distillée sur verre q.s.p. 1 000 ml, pH 7 ± 0,1 après stérilisation) (POISSON et CAHAGNIER, 1972).

Après une heure de pré-trempage, à la température du laboratoire, la suspension est homogénéisée durant deux minutes à 12 500 t/min sans échauffement sensible (⩽ + 3 °C). Les dilutions décimales sont effectuées aussitôt après, à l'aide du même diluant. Le coefficient de variation qui affecte la répétabilité du dénombrement est voisin de 4 p. 100 pour les bactéries et de 11 p. 100 pour les moisissures, valeurs faibles pour ce type de méthode.

Avant d'appliquer cette technique aux aliments expérimentaux, les vérifications suivantes ont été effectuées :

- un broyage d'une durée de 2 min libère plus de micro-organismes que des broyages plus courts, 0,5 ou 1 min;
- le nombre de micro-organismes libérés par g de produit est plus élevé à partir de 150 que de 50 — 100 ou 200 g; le volume optimal de diluant est de 400 ml (300 ou 500 ml procurent des résultats inférieurs);
- un pré-trempage d'une heure permet d'obtenir, après broyage une suspension passant entièrement au tamis de nylon de 1 mm d'ouverture de maille, alors que le refus est de 45 p. 100 après 30 min de trempage.
- il n'y a aucun signe de multiplication des micro-organismes pendant l'heure de pré-trempage à 22 °C (N'GUYEN THI, 1973);
- aucune interférence avec le résultat des dénombrements n'est notée, même avec les quantités maximales d'agents conservateurs entraînées dans le milieu de culture avec la suspension aqueuse d'aliment.

Le choix du modèle de broyeur est justifié par la possibilité qu'il offre de travailler aseptiquement sur un poids d'agglomérés important et sans risque de contamination. En effet, couteaux et bols sont solidaires et le couvercle coiffe les bols sans joints : la stérilisation des 3 parties n'exige qu'une seule opération.

Pâtées pour visons

A chaque prélèvement, les boulettes d'aliment humide sont homogénéisées aseptiquement dans un mortier. Le dénombrement des micro-organismes est effectué à partir de 10 g environ d'homogénéisat pesés aseptiquement et mis en suspension par agitation dans 90 ml de diluant stérile (cf. agglomérés pour rats).

d) *Milieux et conditions de culture*

Les bactéries aérobies mésophiles sont dénombrées sur la gélose « standard pour dénombrement » de l'Institut Pasteur (peptone 5 g, extrait de levure déshydratée 2,5 g, glucose 1 g, agar-agar 15 g, eau distillée sur verre 1 000 ml, pH final 7,0 ± 0,2 en présence d'actidione (solution à 1 ‰ ajoutée au milieu de culture prêt à couler à raison de 10 %). Les lectures sont effectuées après 72 h d'incubation à 30 °C ± 1. Les lactobacilles sont dénombrés sur milieu de ROGOSA, MITCHELL et WISEMAN (1951).

Les levures et les moisissures sont dénombrées sur malt gélosé (extrait de malt 20 g, agar-agar 15 g, eau distillée sur verre q.s.p. 1 000 ml, pH final 7,0 ± 0,2) et sur milieu pour germes osmophiles (saccharose 200 g, malt 20 g, agar-agar 15 g, eau distillée sur verre q.s.p. 1 000 ml, pH final 7 ± 0,2 en présence d'oxytétra-

cycline (solution stérile à 1 ‰ ajoutée aux milieux de culture prêts à couler, à raison de 10 % de leur volume). Les lectures sont effectuées après 72 heures d'incubation à 24 °C pour les levures et après 7 à 10 jours pour les moisissures. Les résultats sont exprimés par gramme de l'échantillon humide.

Résultats

Aliments agglomérés pour rats de laboratoire

Avec l'acide sorbique (AS), l'évolution du coefficient de destruction (rapport entre les quantités de micro-organismes dénombrés avant et après traitement) des bactéries et des moisissures (la présence de levures n'a pas été mise en évidence) au moment du traitement, décrit une courbe sigmoïde (fig. 1) en fonction de la dose appliquée. En outre, il apparaît que peu de temps après le traitement (2 h), l'action de l'AS sur les bactéries est plus forte que sur les moisissures. Néanmoins, cette action est de faible importance puisque la réduction du nombre de bactéries, dans les meilleures conditions, n'est que de 36 fois.

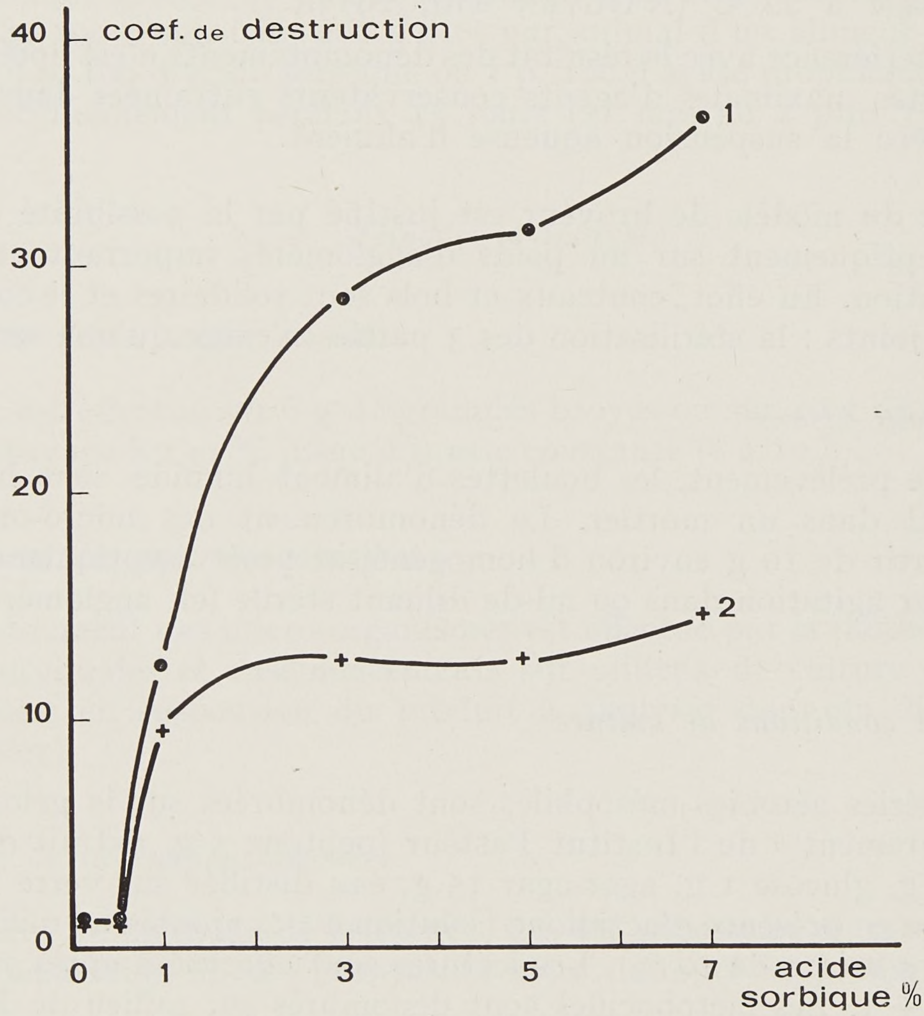


FIG. 1. — *Action de l'acide sorbique sur la population microbienne des granulés pour rats (teneur en eau 19 % sh) 2 heures après le traitement.*

1 bactéries.
2 moisissures.

Abscisse : dose d'acide sorbique en p. 100 de la masse de granulés traités.
Ordonnée : coefficient de destruction.

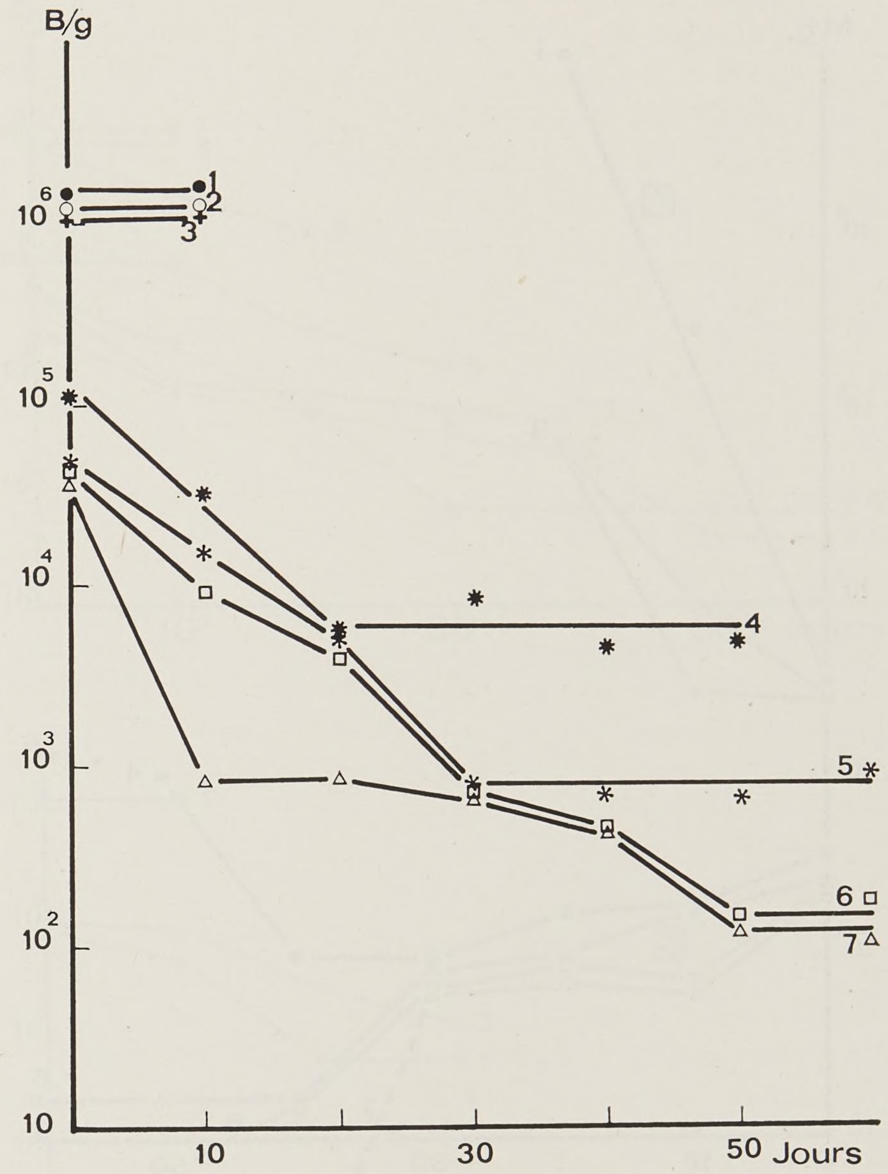


FIG. 2. — *Influence de l'acide sorbique (AS) sur l'évolution quantitative de la population bactérienne des granulés (teneur en eau 19 % sh) stockés dans les bocaux sous H.R. correspondante (85 %) à 23 °C.*

Abscisse : durée de stockage en jour.
Ordonnée : nombre de bactéries par gramme de granulés.

1 témoin.
2 AS 0,05 p. 100 du poids des granulés humides.
3 AS 0,5 p. 100 du poids des granulés humides.
4 AS 1 p. 100 du poids des granulés humides.
5 AS 3 p. 100 du poids des granulés humides.
6 AS 5 p. 100 du poids des granulés humides.
7 AS 7 p. 100 du poids des granulés humides.

Au cours de la conservation, on observe, dans les lots traités avec 0,05 et 0,5 p. 100 d'AS comme dans le lot témoin, un nombre de bactéries pratiquement stable pendant les 10 premiers jours de stockage (les lots témoins étant moisis au bout de ce laps de temps, les essais sont arrêtés). Avec les doses de 1 — 3 — 5 et 7 p. 100 AS, l'action dépressive du traitement (fig. 2) se poursuit au début du stockage, la régression des bactéries étant d'autant plus importante et prolongée que la dose est plus élevée. Au-delà de cinquante jours de stockage, aux deux doses les plus élevées, la population bactérienne résiduelle est presque uniquement constituée par des bactéries sporulées.

L'évolution globale du nombre de moisissures (fig. 3) se fait en 3 phases; une

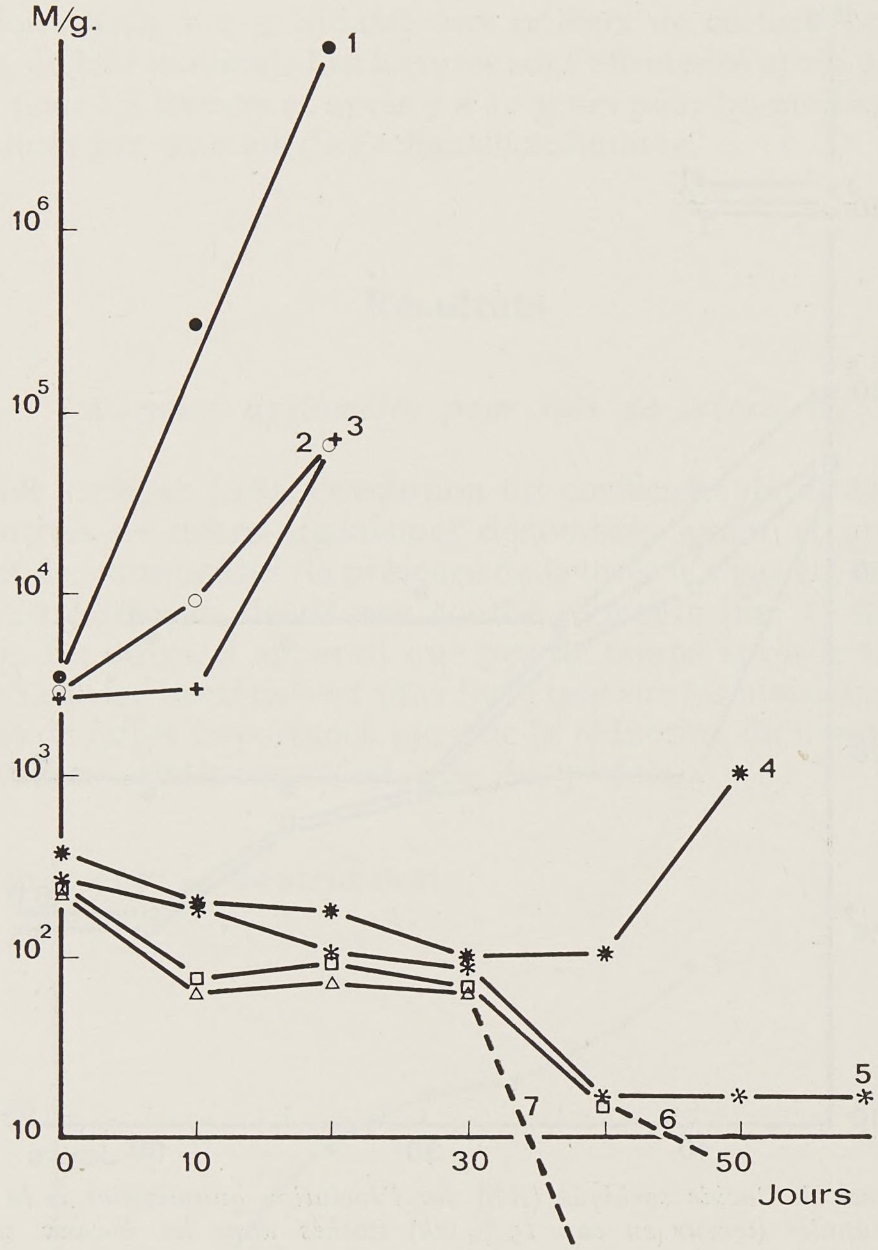


FIG. 3. — *Influence de la dose d'acide sorbique (AS) sur l'évolution quantitative de la population des moisissures des granulés (teneur en eau 19 % sh) stockés en bocaux sous H. R. correspondante (85 %) à 23 °C.*

Abscisse : durée du stockage en jour.
Ordonnée : nombre de moisissures par gramme de granulés.

1 témoin,
2 AS 0,05 p. 100 du poids des granulés humides.
3 AS 0,5 p. 100 du poids des granulés humides.
4 AS 1 p. 100 du poids des granulés humides.
5 AS 3 p. 100 du poids des granulés humides.
6 AS 5 p. 100 du poids des granulés humides.
7 AS 7 p. 100 d poids des granulés humides.

phase de déclin (qui peut passer inaperçue, comme aux doses de 0,05 et 0,5 %), suivie d'une période de latence, puis d'une multiplication. Les durées des deux premières périodes sont d'autant plus longues que les doses sont plus élevées (40 j environ à la dose de 1 %, plus de 60 j, aux doses de 5 et 7 %). A partir du moment où la colonisation des agglomérés par les moisissures commence à être décelable, elle est extrêmement rapide. Des *Mucor* prédominent dans le témoin et les lots traités avec 0,05 et 0,5 p. 100 d'AS, des *Aspergillus* (*glaucus* et *candidus*) prédominent dans le lot traité avec 1 p. 100 d'AS. Aux doses plus fortes (3 — 5

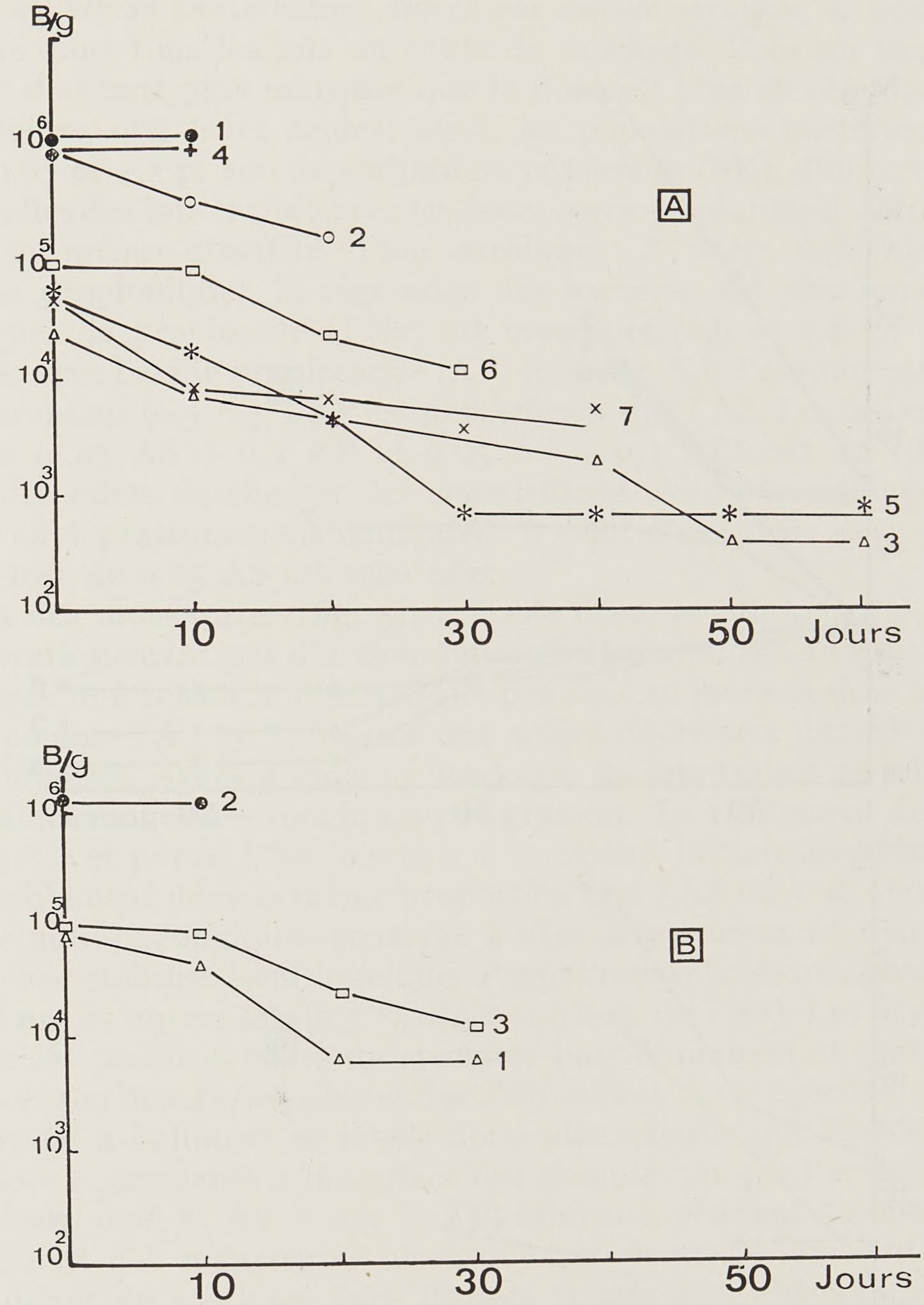


FIG. 4. — *Évolution du nombre de bactéries des granulés (teneur en eau 19 % sh) traités avec divers conservateurs (acide sorbique (AS), sorbate de potassium (SK), acide propionique (AP) et propionate de sodium (PNa) et stockés en bocaux sous H.R. correspondante (85 %) à 23 °C.*

Fig. 4A

1 témoin.
2 SK 0,67 p. 100 du poids des granulés humides.
3 SK 4,2 p. 100 du poids des granulés humides.
4 AS 0,5 p. 100 du poids des granulés humides.
5 AS 3 p. 100 du poids des granulés humides.
6 AP 0,5 p. 100 du poids des granulés humides.
7 PNa 0,6 p. 100 du poids des granulés humides.

Fig. 4B

1 AS 0,05 p. 100 + AP 0,5 p. 100 du poids des granulés humides.
2 AS 0,05 p. 100 + AP 0,5 p. 100 du poids des granulés humides.
3 AP 0,5 p. 100 + AP 0,5 p. 100 du poids des granulés humides.

et 7 %), seuls quelques *Penicillium* et *Aspergillus* subsistent en fin de stockage.

Les agglomérés stockés en sachets de matière plastique n'ont pas fait l'objet d'analyse microbiologique. A l'issue de la période d'essai (2 mois) seuls les lots traités avec 3 — 5 et 7 p. 100 d'AS n'étaient pas visiblement moisis.

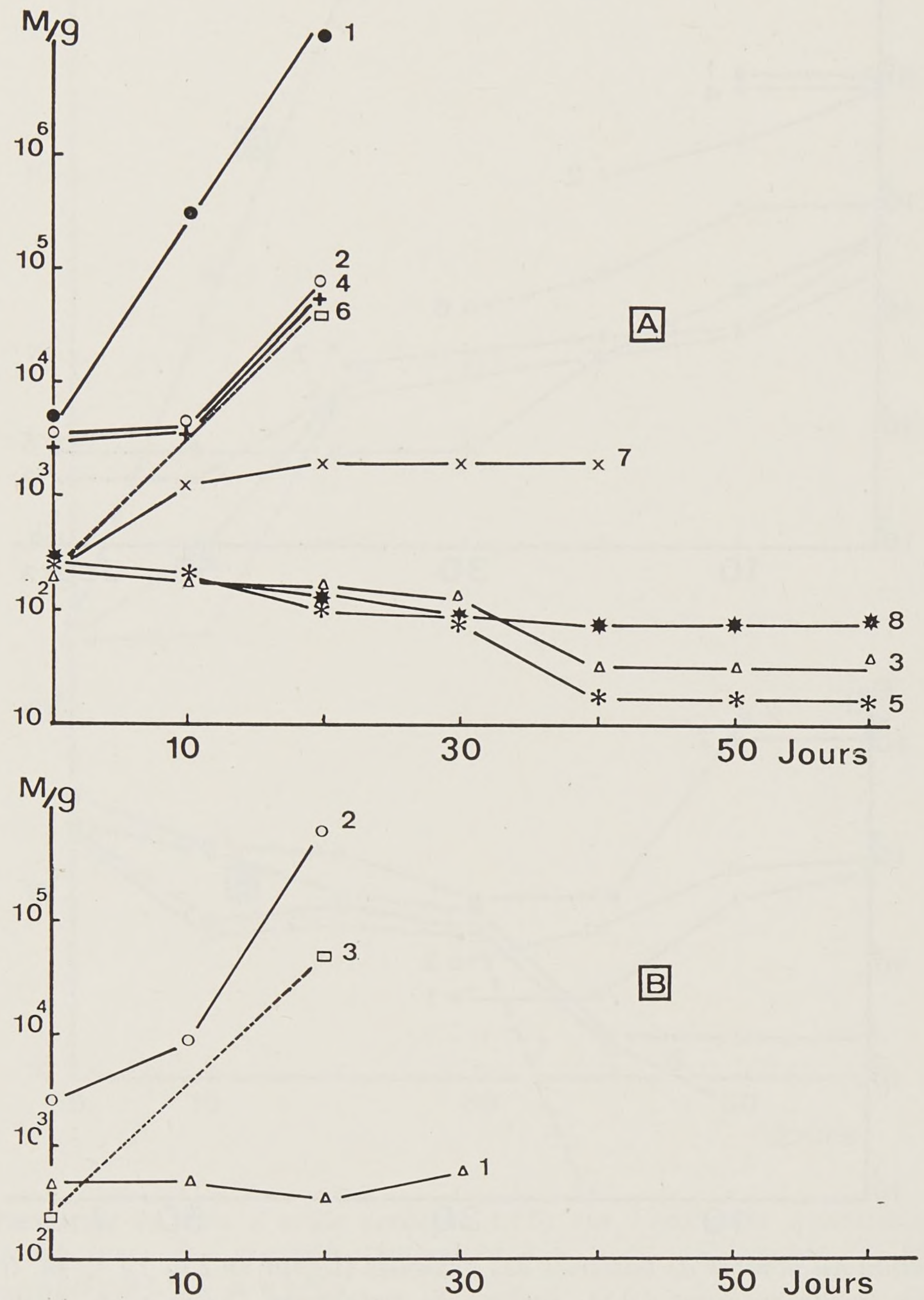


FIG. 5. — *Évolution du nombre de germes de moisissures des granulés (teneur en eau 19 % sh) traités avec divers conservateurs (acide sorbique (AS), sorbate de potassium (SK), acide propionique (AP) et propionate de sodium (PNa) et stockés en bocaux sous H.R. correspondante (85 %) à 23 °C.*

Fig. 5A

1 témoin.
2 SK 0,67 p. 100 du poids des granulés humides.
3 SK 4,2 p. 100 du poids des granulés humides.
4 AS 0,5 p. 100 du poids des granulés humides.
5 AS 3 p. 100 du poids des granulés humides.
6 AP 0,5 p. 100 du poids des granulés humides.
7 PNa 0,6 p. 100 du poids des granulés humides.
8 PNa 1,2 p. 100 du poids des granulés humides.

Fig. 5B

1 AS 0,05 p. 100 + AP 0,5 p. 100 du poids des granulés humides.
2 AS 0,05 p. 100 + AP 0,5 p. 100 du poids des granulés humides.
3 AP 0,5 p. 100 + AP 0,5 p. 100 du poids des granulés humides.

Avec les agents de conservation autres que l'acide sorbique, le nombre de bactéries diminue dans tous les lots au cours du stockage. Pour un même agent, la régression est d'autant plus marquée que la dose est plus élevée (fig. 4). Les sels sont plus efficaces que leurs acides; ainsi, les populations bactériennes des lots traités avec 0,67 et 4,2 p. 100 de sorbate de potassium (SK), diminuent plus rapidement que celles des lots traités avec les doses correspondantes d'AS 0,5 et 3 p. 100 (renfermant la même quantité d'ion sorbique). A doses équivalentes (même quantité d'ion propionique), la régression des bactéries est plus importante dans les lots auxquels le propionate (PNa) est incorporé (0,6 et 1,2 %) que dans les lots pulvérisés avec l'acide propionique (AP) (0,5 et 1 %). Pour une même quantité d'agent conservateur (0,5 %), l'AP est plus efficace que l'AS. Les mélanges d'agents conservateurs (0,05 AS + 0,5 AP et 0,05 AS + 0,3 AP) ont un effet supérieur à la somme des effets de chacun des constituants. Ainsi, le mélange 0,05 AS + 0,5 AP a un effet pratiquement équivalent à celui d'une dose de 1 p. 100 d'AP, alors que la dose de 0,05 AS est sans effet.

Vis-à-vis des moisissures (fig. 5), à faible dose, le SK (0,67 %), comme l'AS (0,5 %), n'a pratiquement pas d'action dépressive au moment du traitement; par la suite, il n'exerce une action inhibitrice que pendant 10 jours. A dose plus élevée, le SK (4,2 %), comme l'AS (3 %) exerce une action dépressive durable sur la mycoflore des agglomérés. Après 2 mois de stockage, les lots traités ne renferment que quelques dizaines de germes fongiques par gramme. Le traitement des agglomérés par l'AP (0,5 %) et par le PNa (0,6 et 1,2 %) réduit initialement leur population fongique sensiblement dans la même proportion que l'AS de 1 p. 100. Tandis que le nombre de germes fongiques continue à décroître lentement dans le lot PNa 1,2 p, 100, puis se stabilise (seuls quelques *Penicillium* subsistent), les moisissures se multiplient dans les autres lots (0,5 % d'AP et 0,6 % de PNa). Les *Mucor* prennent leur essor dès les premiers jours de stockage puis diminuent et sont progressivement remplacés par des *Aspergillus* et des *Penicillium.* A cet égard, le propionate de sodium incorporé à l'aliment se révèle donc plus efficace que l'acide propionique pulvérisé à dose équivalente à la surface des granulés ou que l'acide sorbique. Les mélanges utilisés (0,05 % AS + 0,3 % AP) inhibent, pendant 3 semaines environ, le développement des moisissures alors que ces dernieres semblent prendre leur essor dès le début du stockage dans les lots traités avec chacun des composants séparément à ces doses.

Notons enfin qu'à l'issue de la période d'essai de conservation en sacs plastiques (2 mois), seuls, les agglomérés traités avec 4,2 p. 100 de sorbate de potassium et 1,2 p. 100 de propionate de sodium n'étaient pas visiblement moisis.

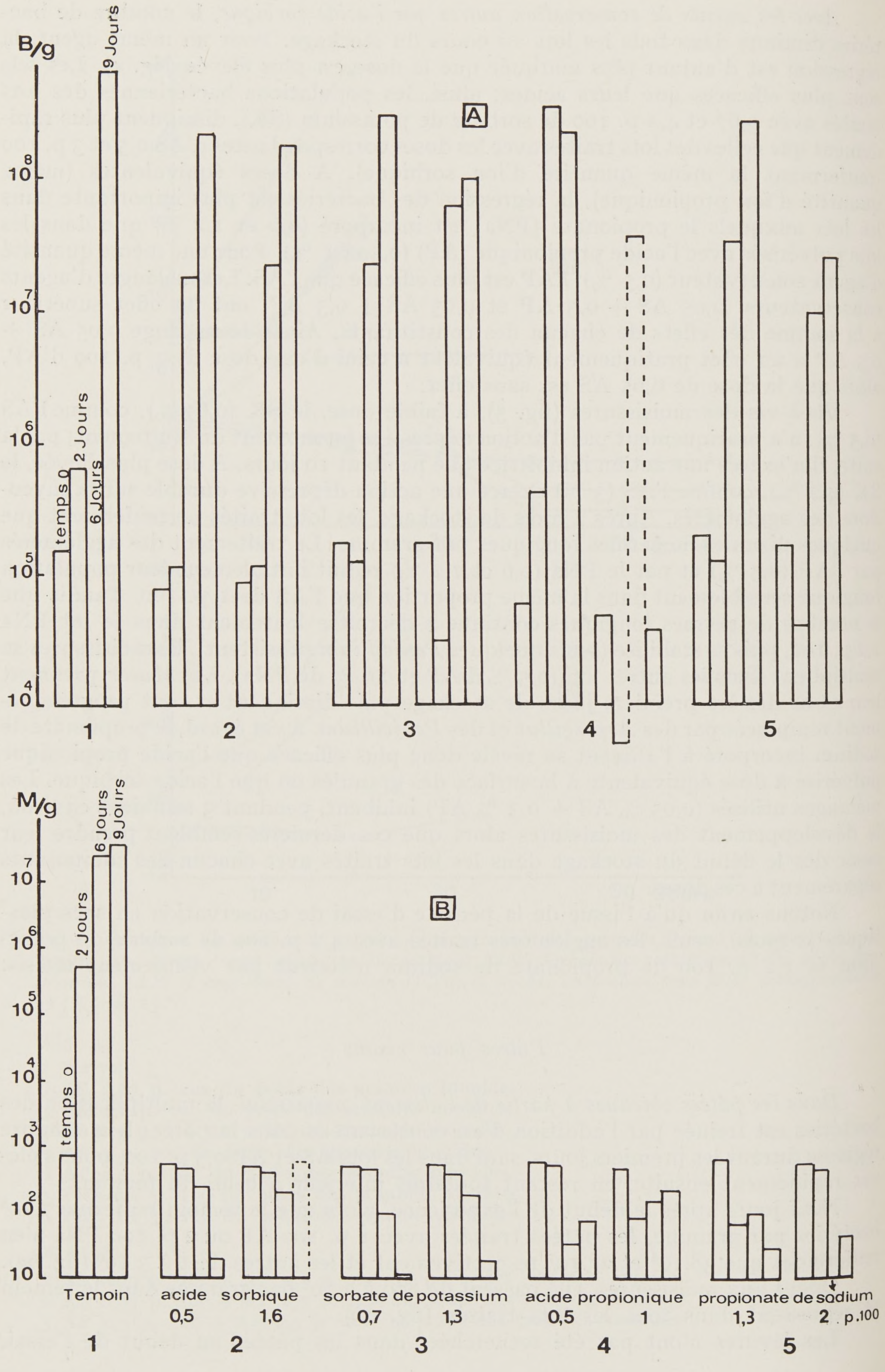
Pâtées pour visons

Dans les pâtées obtenues à partir de l'aliment commercial, la multiplication des bactéries est freinée par l'addition d'un conservateur dans la pâtée; leur nombre régresse durant les premiers jours, sauf dans les lots AS et AP 0,5 p. 100, pour s'élever rapidement ensuite, en restant toutefois inférieur à celui du témoin.

Neuf jours après le début de l'expérience, alors que le témoin renferme 7.10^8 bactéries par gramme, les pâtées traitées avec 1 p. 100 AP ou 2 p. 100 PNa n'en renferment que 38.10^4 et 27.10^7 respectivement et les autres de 1 à 3.10^8 (fig. 6*a*).

Quant aux moisissures, elle passent de 800 à 2.10^7 par gramme dans le témoin et régressent dans tous les lots traités (fig. 6*b*).

Les levures n'ont pas été recherchées dans les pâtées au début de l'essai.


B/g
A
temps 0
2 Jours
6 Jours
9 Jours
1
2
3
4
5
M/g
B
temps o
2 Jours
6 Jours
9 Jours
Temoin
acide sorbique
0,5
1,6
sorbate de potassium
0,7
1,3
acide propionique
0,5
1
propionate de sodium
1,3
2 p.100
1
2
3
4
5

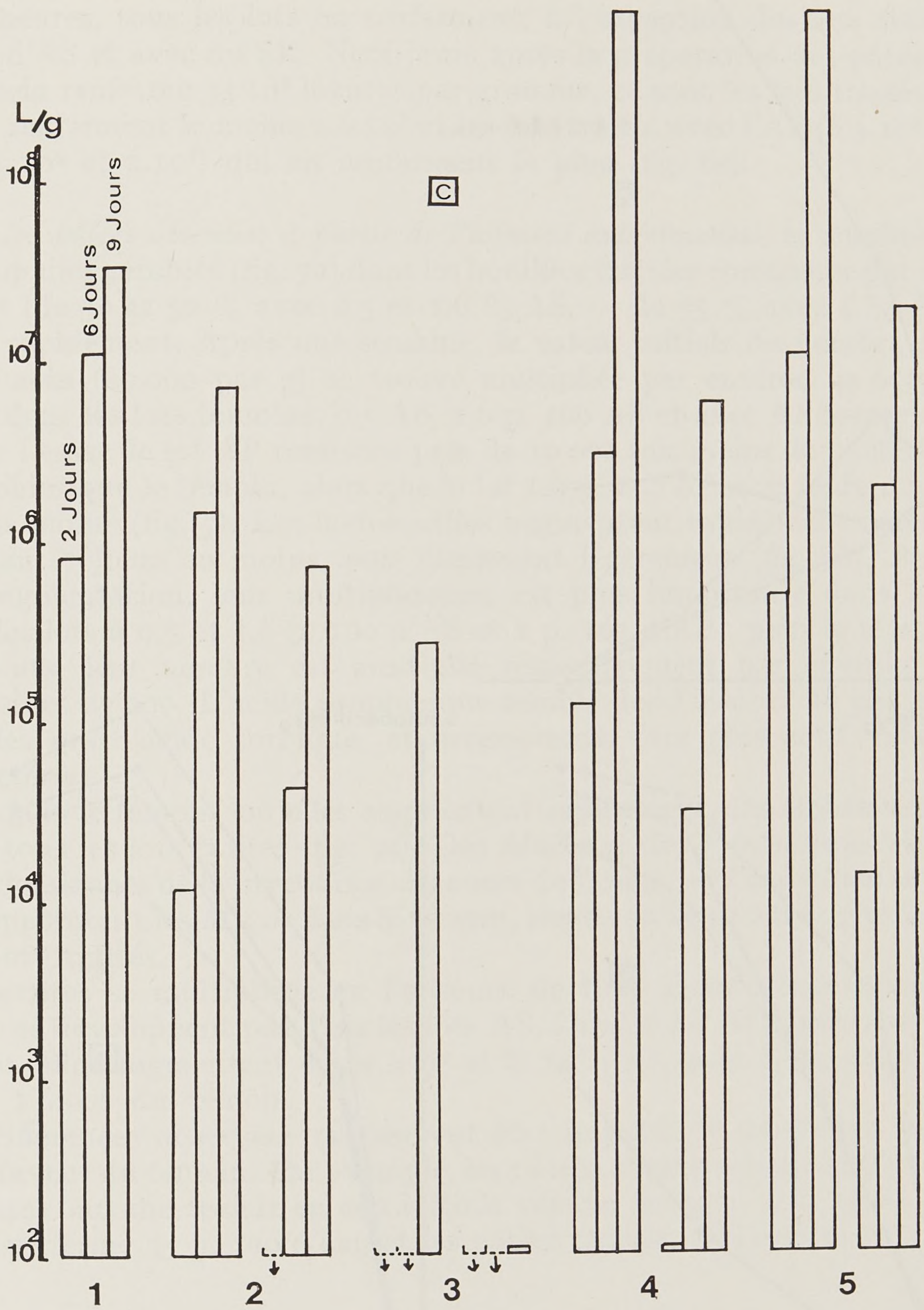


FIG. 6. — *Évolution de la microflore de pâtées pour visons obtenues à partir d'un mélange commercial traité par différents conservateurs (acide scorbique (AS), sorbate de potassium (SK), acide propionique (AP), propionate de sodium (PNa), et stockées à 20 °C sous H.R. de 90 p. 100.*

A Bactéries aérobies mésophiles.
B Moisissures.
C Levures.

Abscisse : Nature et dose des conservateurs :

1 témoin.
2 AS 0,5 et 1,6 p. 100 du poids de granulés humides.
3 SK 0,7 et 1,3 p. 100 du poids de granulés humides.
4 AP 0,5 et 1 p. 100 du poids de granulés humides.
5 PNa 1,3 et 2 p. 100 du poids de granulés humides.

Ordonnée : nombre de germes microbiens par gramme de pâtée.

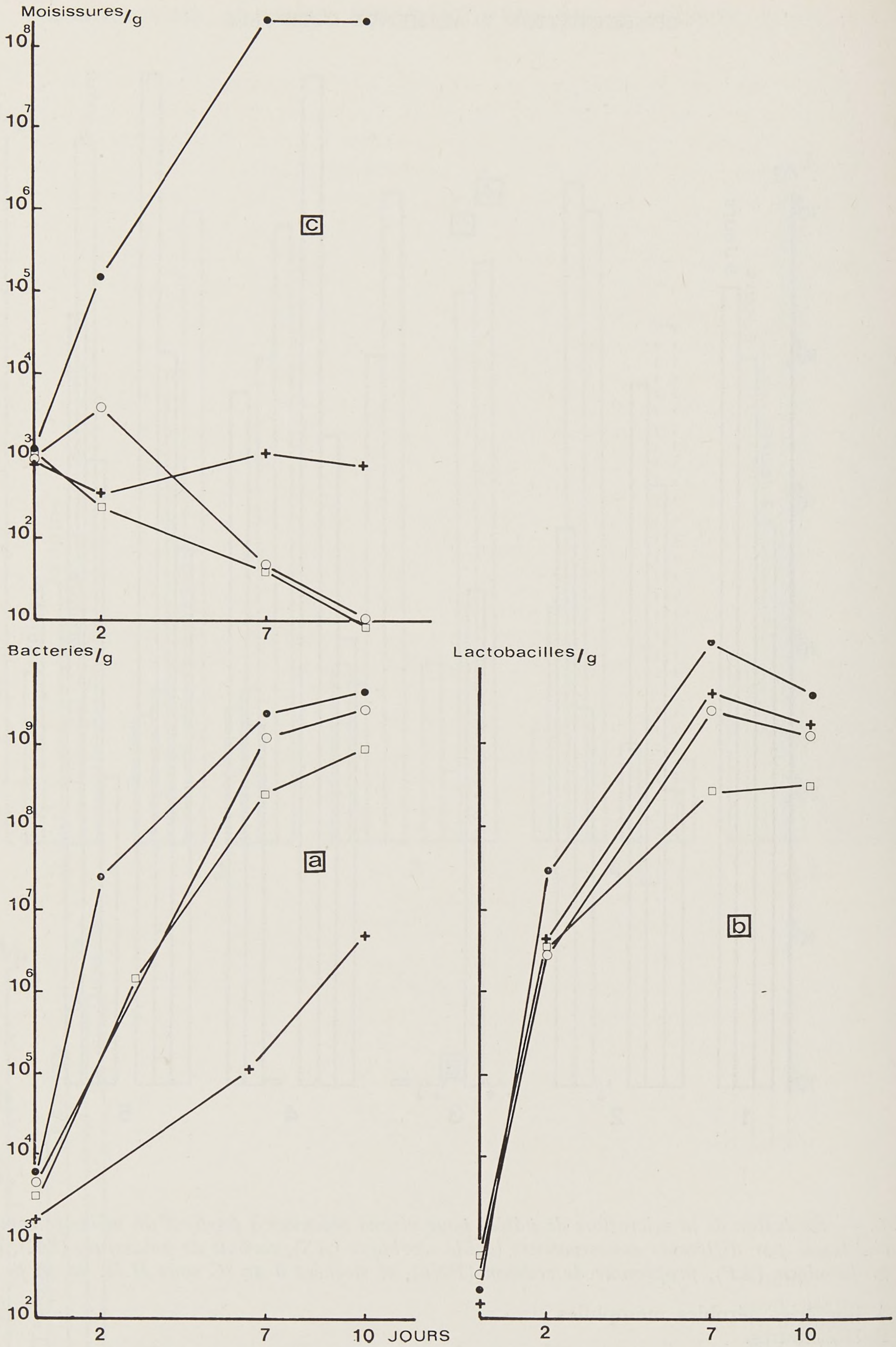


FIG. 7. — *Évolution de la microflore de pâtées pour visons obtenues à partir d'un mélange expérimental traité par différents conservateurs et stockées à 20 °C sous H.R. de 90 p. 100.*

• Témoin — O, AS 0,5 % — □, AS 1,6 % — +, AP 1 %.
a bactéries aérobies, mésophiles.
b lactobacilles.
c moisissures.

Abscisse : durée de stockage en jours.
Ordonnée : nombre de germes microbiens par gramme de pâtée.

Après 48 heures, tous les lots en renferment, à l'exception des lots traités avec 1,6 p. 100 d'AS et avec du SK. Neuf jours après la préparation des pâtées, tandis que le témoin renferme 33.10^6 levures par gramme, ce sont les lots traités avec du SK qui en renferment le moins $2,6.10^5$ et les lots traités avec l'AP ($8,5.10^8$ et $6,10^6$) ou PNa (9.10^8 et 2.10^7) qui en renferment le plus (fig. 6*c*).

Dans les pâtées obtenues à partir de l'aliment expérimental, le nombre de bactéries mésophiles aérobies (fig. 7*a*) dans les bouillies traitées commence par diminuer légèrement (de 30 et 50 % avec 0,5 et 1,6 % AS, — de 75 % avec 1 % AP), puis augmente rapidement. Après une semaine, la valeur initiale du nombre de bactéries du témoin (60 000 par g) se trouve multipliée par environ 45 000, 30 000, 9 000 et 7 dans les lots témoins, 0,5 AS, 1,6 p. 100 AS et avec AP respectivement. A la fin de l'essai, le lot AP renferme près de 10 000 fois moins de bactéries mésophiles aérobies que le témoin, alors que le lot 1,6 p. 100 AS n'en renferme que cinquante fois moins (fig. 7). Les lactobacilles augmentent rapidement dans tous les lots, pendant 7 jours au moins, puis diminuent légèrement (fig. 7*b*). Pendant la phase d'augmentation, leur multiplication est plus importante dans le témoin que dans les lots à 0,5 et 1,6 p. 100 d'AS et 1 p. 100 d'AP : pour le témoin et les 3 traitements, leur nombre est multiplié respectivement par environ 132 000, 9 000, 5 000 et 27 000. L'acide propionique semble donc inhiber un peu moins les lactobacilles que l'acide sorbique, et inversement, être plus actif vis-à-vis des autres bactéries.

Sauf dans le témoin, où elles augmentent rapidement, les moisissures régressent dans tous les lots traités (fig. 7*c*). Des *Mucor* et des *Penicillium* sont les éléments prédominants de la mycoflore. Au cours de l'essai, les *Penicillium* se développent en supplantant les *Mucor* dans le témoin, tandis qu'ils résistent plus longtemps dans les lots traités.

Les levures se multiplient en l'absence de tout agent conservateur, tandis qu'elles ne se développent pas dans les lots AS. Dans le lot AP, après une phase de diminution, elles augmentent entre le 7^e et le 10^e jour, sans dépasser, à la fin de l'essai, le 1/400^e du témoin.

Les différences observées ne peuvent être imputées à des écarts de teneurs en eau en faveur du témoin. Par exemple, les pâtées obtenues à partir d'un mélange expérimental ont une teneur en eau initiale voisine de 54 p. 100; après 10 jours, le témoin renferme 33 p. 100 d'eau et les pâtées traitées en renferment 44 p. 100.

Discussion et conclusions

Les données nécessaires pour établir une correspondance entre l'importance numérique et la nature des populations de moisissures des aliments pour animaux d'une part, et leur qualité hygiénique et nutritionnelle d'autre part, sont encore très imprécises (LAFFOND-GRELLETY, 1972). Aussi, pour établir un diagramme de conservation, plutôt qu'un niveau de pollution arbitraire, a-t-il paru préférable de choisir, comme seuil de début d'altération des granulés, le moment où leur population fongique commence à augmenter.

En tenant compte des dates du prélèvement qui, le premier, révèle une augmentation du nombre de moisissures et du précédent, il est possible de délimiter une zone à l'intérieur de laquelle se situe le démarrage des moisissures

(fig. 8). Le seuil ainsi défini est très sévère, puisqu'il correspond à un faible niveau de pollution; néanmoins, il est atteint peu de temps avant le moment où quelques moisissures (*Mucor*) commencent à être visibles, entraînant un début de dégradation de l'aspect et donc de la qualité commerciale du produit.

Il est à noter que les durées de conservation d'aliments pour animaux, signalées par LUCK *et al.* (1972) sont plus longues que celles observées dans le cas présent, pour des doses équivalentes d'acide sorbique. Cependant, la comparaison avec nos résultats est difficile, car les conditions expérimentales dans lesquelles ont été effectués leurs essais (température et humidité relative, par exemple) sont insuffisamment définies, ainsi que les critères choisis pour évaluer la durée de conservation.

Pour répondre aux exigences de la pratique, l'aliment rat doit pouvoir se conserver pendant deux mois environ. D'après les résultats de nos essais, il est possible d'obtenir une telle durée de stabilité en incorporant aux agglomérés, les conservateurs indiqués ci-dessous :

— acide sorbique à la dose de 3 p. 100;
— sorbate de potassium à la dose de 4,2 p. 100;
— propionate de sodium à la dose de 1,2 p. 100.

Ces données fragmentaires ne sont valables que dans des conditions de stockage proches de celles de nos essais. Il est toutefois vraisemblable que les doses d'acide sorbique et de sorbate de potassium puissent être abaissées : extrapolant les indications données par les courbes isothermes de conservation (fig. 8), il semble, en effet, qu'une dose de 1,2 p. 100 d'acide sorbique suffise à assurer la bonne conservation, à 23 °C, de l'aliment pour rat ayant une teneur en eau de 19 p. 100.

A partir des caractéristiques de sorption d'un produit, il est possible de définir approximativement les limites de la zone hydrique à l'intérieur de laquelle il se maintient en bon état (SEMENIUK, 1954; CHRISTENSEN et KAUFMANN, 1965;

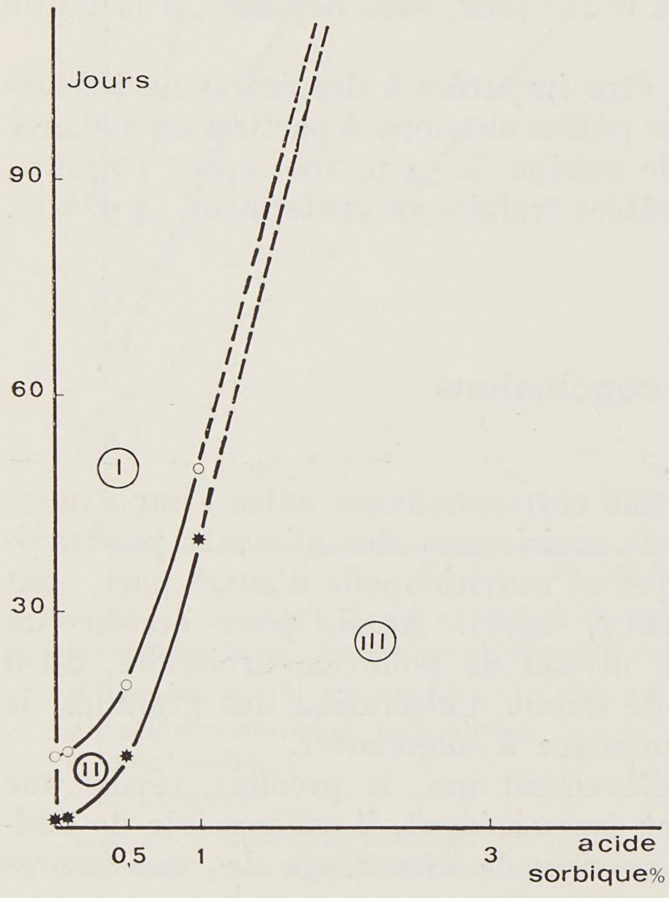


FIG. 8. — *Isotherme (23 °C) de conservation des granulés traités par l'acide sorbique.*

Abscisse : dose d'acide sorbique en p. 100 du poids de granulés humides.

Ordonnée : durée de stockage en jour.

o date du prélèvement qui le premier révèle une augmentation du nombre des moisissures.

* date du prélèvement précédent.

I Zone de multiplication des moisissures.
II Zone de démarrage des moisissures.
III Zone de non développement des moisissures.

GUILBOT, 1967; MULTON *et al.*, 1969). De fait, nos résultats expérimentaux confirment bien, les prévisions qu'il est possible d'établir à partir de l'isotherme de sorption 24 °C (fig. 9) de l'aliment pour rat : la teneur en eau de 19 p. 100 à laquelle il est fabriqué est suffisamment basse pour qu'il soit à l'abri de toute prolifération bactérienne pendant la durée des essais à des températures voisines de 24 °C. L'addition de « conservateurs » a simplement pour effet, dans cette zone, d'accélérer la régression des bactéries (fig. 2 et 4). Par contre, à cette teneur en eau, pour laquelle le produit est en équilibre hydrique avec une humidité relative de

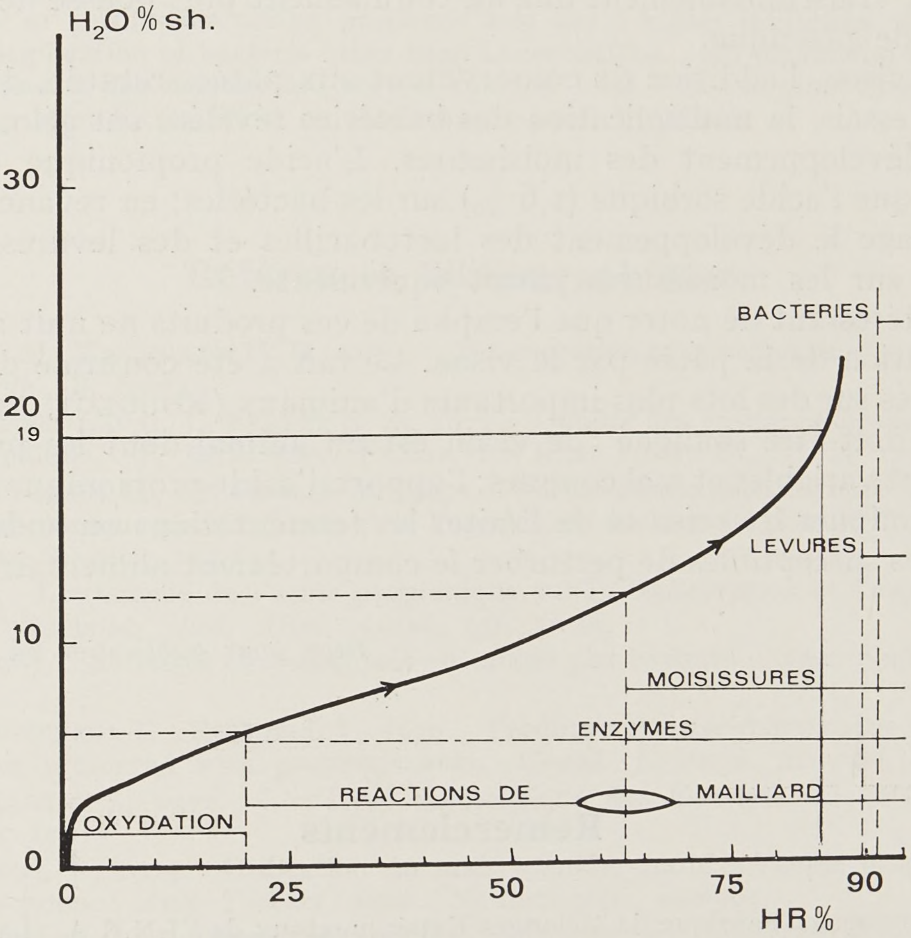


FIG. 9. — *Isotherme de sorption (24 °C) des granulés pour rats, montrant l'influence du facteur « humidité relative » sur les principales causes possibles d'altération.*

Abscisse : humidité relative p. 100 de l'atmosphère.
Ordonnée : teneur en eau des granulés pour rats en p. 100 de la substance humide.

85 p. 100, les moisissures se développent et compromettent assez rapidement sa qualité, s'il n'est pas traité.

A concentration moléculaire équivalente, le sorbate de potassium est plus actif que l'acide sorbique et que le propionate de sodium; l'acide sorbique est plus actif que l'acide propionique. Dans un cas comme dans l'autre, la plus grande efficacité du traitement est certainement due à une meilleure répartition du « conservateur » dans la masse des agglomérés. En effet, le sorbate de potassium est beaucoup plus soluble que l'acide sorbique, ce qui lui assure une diffusion plus homogène au sein de l'aliment au moment de l'addition d'eau, avant passage dans la presse. L'acide propionique est pulvérisé sur les agglomérés finis, alors que le propionate est mélangé aux composants de l'aliment dès le début de la préparation, ce qui lui assure une meilleure répartition.

Les mélanges d'acide sorbique et d'acide propionique expérimentés ont un effet dépressif supérieur à la somme des effets de l'une et de l'autre substance présente séparément. Ceci vérifie bien le fait que ces deux acides agissent en synergie (LUCK *et al.*, 1972). Cette propriété donne la possibilité de n'employer que de très faibles doses d'agents conservateurs et d'abaisser ainsi le coût du traitement. L'apparition des moissures se produit plus tardivement sur les agglomérés stockés en sachets de matière plastique qu'en bocaux (quelques jours plus tard pour les lots traités avec 1 % d'acide sorbique, deux mois plus tard, pour les lots traités avec 1,2 % de propionate de sodium); la teneur en eau n'ayant pas varié, cette différence est vraisemblablement due au confinement plus poussé de l'atmosphère des sachets de plastique.

Pour le vison, l'addition de conservateur aux pâtées retarde, dans les conditions de nos essais, la multiplication des bactéries révélées sur gélose nutritive et entrave le développement des moisissures. L'acide propionique (1 %) semble plus efficace que l'acide sorbique (1,6 %) sur les bactéries; en revanche, ce dernier gêne davantage le développement des lactobacilles et des levures; l'action des deux acides sur les moisissures paraît équivalente.

Il est intéressant de noter que l'emploi de ces produits ne nuit aucunement à la consommation de la pâtée par le vison. Ce fait a été confirmé depuis par des essais effectués sur des lots plus importants d'animaux (ROUGEOT, 1976). Son intérêt pratique doit être souligné : le vison est un animal dont les préférences alimentaires sont variables et mal connues; l'apport d'acide propionique dans la ration permet de diminuer les refus et de limiter les fermentations ou le développement de moisissures susceptibles de perturber le comportement alimentaire de l'animal.

Reçu pour publication en avril 1977.

Remerciements

Nous remercions la Fabrique de Mélanges Expérimentaux de l'I.N.R.A. (La Minière, 78280 Guyancourt) pour la préparation des aliments expérimentaux pour le Rat et le Vison.

Summary

The storage of composed foods for rats and minks after addition of preserving agents. Microbiological evolution.

It is difficult to preserve foods for small animals, i.e. pellets for rats and mashes for minks. For example, pellets for rats often have such a high water content(19 p. 100) that a rapid fungic proliferation may take place. In minks mashes, with awater content of about 50 to 55 p. 100 the bacterial and fungic germs multiply actively.

In order to prevent with these disadvantages, we propose the addition of sorbic acid, potassium sorbate, propionic acid and sodium propionate. These are antimicrobial and non toxic preserving agents for warm-blood animals.

The present study deals with the microfloral behaviour in the check pellets and mashes or in the products after addition of preserving agents. This allows to assess the action and the efficiency of the process.

From the very beginning of the treatment, sorbic acid has a depressive effect upon the microbial flora of the pellets. This action is more marked with regard to bacteria and especially unsporulated bacteria than moulds, among which Mucor are more sensitive than Penicillium and Aspergillus.

The duration of this depressive effect was determined according to the quantity of sorbic acid used. Moulds grew on the pellets only.

It was then possible to develop an isothermal storage diagram (23 °C) from the evolution curves of the pollution level. This diagram shows the recommanded amount of sorbic acid for the desired storage time.

Compared to sorbic acid, potassium sorbate and sodium propionate are more efficient under our experimental conditions. The antimicrobial action of sorbic acid is intensified by propionic acid as a synergist.

In the case of mashes for minks, propionic acid has a higher inhibiting effect than sorbic acid on the multiplication of bacteria other than Lactobacillus. All preserving agents lower the mold germ content of the mashes and keep it at a low level. In the same time, propionic acid seems to have a stimulating effect on food consumption by minks.

Références bibliographiques

CHRISTENSEN C. M., KAUFMANN H. H., 1965. Deterioration of stored grains by fungi. *Annual. Rev. Phytopath.*, **3**, 69-84.

DUMAY C., DELORT-LAVAL J., ZELTER S. Z., 1972. Qualité des ensilages de maïs préservés par l'acide propionique. *J. Rech. porc. France*, I.N.R.A. I.T.P. éd., Paris, 127-134.

FÉVRIER C., BOURDON D., CHAMBOLLE M., 1972. Valeur alimentaire du maïs humide conservé par l'acide propionique pour la Truie et le Porcelet, du maïs ensilé pour le Porc en croissance. *J. Rech. porc. France*, 135-142.

FINK F., 1976. L'influence de l'acide propionique sur la conservation et l'aspect nutritionnel de l'aliment composé. *Ind. Alim. Anim.*, (3), 31-36.

GUILBOT A., 1967. Activités enzymatiques en milieu peu hydraté. *Ann. Nutr. Alim.*, **21**, 87-112.

JONES G. M., DONEFER E., ELLIOT J. I., 1970. Feeding value for dairy cattle and pigs of high moisture corn preserved with propionic acid. *Canad. J. Anim. Sci.*, **50**, 483-489.

LAFFOND-GRELLETY J., 1972. L'analyse mycologique des aliments du bétail. *Ind. Alim. Anim.*, (1), 9-22.

LELONG C., MOAL J., 1973. Utilisation du maïs humide, traité à l'acide propionique par les bovins et les porcs. *Ann. Technol. agric.*, N° hors série, 499-504.

LUCK E., BAHRECKE G., BAGINSKI M., 1972. *Sorbinsaüre als Konservierungsstoffe für Mischfutter.* Alfred Strothe Verlag, Hannover.

MULTON J. L., POISSON J., GUILBOT A., 1969. Les altérations du grain de blé après la récolte. *Bull. Tech. Inform.*, **244**, 1-18.

N'GUYEN T. C., 1973. *Essai de stockage d'aliment pour Rat traité par l'acide sorbique et par quelques autres agents « conservateurs » : sorbate de potassium, acide propionique et propionate de sodium — Aspect microbiologique.* D.E.A. de biochimie industrielle et alimentaire, Fac. Sciences, Paris.

POISSON J., CAHAGNIER B., 1972. Aspect microbiologique de la conservation du maïs grain humide par l'acide propionique. *Ann. Technol. Agric.*, **21** (2), 99-122.

ROGOSA M., MITCHELL J. A., WISEMAN R. F., 1951. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J. Bacteriol.*, **62**, 132-133.

ROUGEOT J., 1976. Communication personnelle.

SEMENIUK K. H., 1954. *Microflora in storage of cereal grains and their products.* A.A.C. St-Paul, Minnesota, 77-151.

YOUNG L. G., BROWN R. G., SHARP B. A., 1970. Propionic acid preservation of corn for pigs. *Canad. J. Anim. Sci.*, **50**, 711-715.

Ann. Technol. Agric., 1977, **26** (1), 79-115.

MISE AU POINT BIBLIOGRAPHIQUE

Composition glucidique du blé

Jutta CERNING-BEROARD, Christiane MERCIER et A. GUILBOT

Centre de Recherches de Nantes, I.N.R.A.,
Laboratoire de Biochimie des Aliments,
Chemin de la Géraudière, 44072 Nantes Cedex

Résumé

Les glucides sont les constituants les plus importants du grain de blé. Ils représentent environ 80 p. 100 de la matière sèche totale. Ils peuvent être répartis en macromolécules glucidiques, tels que l'amidon, le glucide prépondérant, la cellulose, les hémicelluloses et les pentosanes, et en oses et oligosides, du type di-, et trioligoside tels que le glucose, le saccharose, le neokestose, le raffinose et le glucodifructose.

Au cours de cette revue bibliographique, les aspects qualitatif et quantitatif des glucides précités sont examinés. Leur localisasion histologique dans le péricarpe, l'albumen amylacé et le germe du grain de blé est rapportée.

Durant la maturation du blé, l'évolution des glucides du grain, uniquement en fonction des températures moyennes journalières cumulées depuis la floraison, a montré que les oses et oligosides sont à leur maximum tout au début du développement des grains. Ils diminuent ensuite progressivement au profit de l'amidon, des pentosanes et des matières cellulosiques qui s'accumulent rapidement.

L'altération des glucides au cours du stockage du blé se traduit par une augmentation des oligosides solubles et des sucres réducteurs; ce phénomène est dû à une teneur en eau trop élevée des grains, ainsi qu'à leur température, conduisant à la croissance des moisissures lors de la conservation. Des essais réalisés sous atmosphère d'azote, de CO_2, et dans des conditions anaérobies, ont conduit à une altération des glucides du grain aussi rapide que pour ceux stockés dans des conditions aérobies.

Bien que fragmentaires, les connaissances sur l'évolution des glucides au cours de la germination du grain de blé, montrent le rôle prédominant de l'action combinée de l'α- et de la β-amylase qui provoque la dégradation de l'amidon avec apparition de maltose.

La composition glucidique de la farine et des produits de mouture du blé, tels que les farines turbo-séparées, le son et le germe commerciaux, est largement discutée. Une comparaison de la composition glucidique des produits de mouture américains et européens, s'est avérée difficile, du fait de technologies différentes. Une tentative de comparaison de ces technologies est présentée dans un histogramme relatant les taux d'extraction moyens du blé commercial en France, en Allemagne et aux U.S.A.

Mots clés : *blé — farine — produits de mouture — composition glucidique — monographie.*

Introduction

Les glucides sont les constituants les plus importants du grain de blé. Ils représentent environ 80 p. 100 de la matière sèche totale, répartis en amidon (63-75 %), le glucide prépondérant, « cellulose » (1,7-3,0 %); hémicelluloses et pentosanes (5,7 —7,9 %) et glucides solubles (2,15—4,0 %). Ces derniers sont constitués principalement d'oses, de di et oligosides.

Dès 1944, BAILEY avait identifié la majorité des glucides du blé. Cependant, la composition quantitative reportée à cette date correspondait à la différence à 100 de la somme des déterminations des matières cellulosiques brutes, azotées, lipidiques et minérales; la détermination directe des différents glucides ne pouvant être effectuée du fait du manque de méthodologie. Le récent développement de nouvelles techniques, telles que le fractionnement par chromatographie sur papier et sur couche mince (CHAMPAGNOL et BOURZEIX, 1971, DE STEFANIS et PONTE, 1968, DRAPRON et GUILBOT, 1962, KOWKABANY, 1954, PARTRIDGE 1946, PARTRIDGE et WESTALL, 1948), la chromatographie de partage gaz-liquide (BISHOP, 1964), l'électrophorèse (FOSTER, 1957) et la chromatographie sur colonne ont été appliquées à la chimie des glucides. De plus, la majorité des glucides solubles peuvent être différenciés par des réactions colorimétriques mettant en œuvre l'orcinol, le résorcinol et l'anthrone (ACKER, 1967, BRUYN *et al.*, 1968, DAVIS et GANDER, 1967, FANG-MING HIN et POMERANZ, 1968, JOHNSON *et al.*, 1964, LŒWUS 1952, VAN HANDEL, 1967).

Enfin l'utilisation récente d'enzymes pour l'analyse des glucides a permis la détermination spécifique de l'amidon (THIVEND *et al.*, 1965-72) des oses et des oligosides présents dans le grain de blé, tels que le glucose, le fructose, le saccharose et le raffinose (AVIGAD *et al.*, 1962, COOPER *et al.*, 1959, HUGGETT et NIXON, 1957, JOHNSON *et al.*, 1964, ROTH *et al.*, 1965). Il n'en reste pas moins que des travaux de recherches sont encore à effectuer, du fait de l'application des techniques précitées, dans des conditions bien définies.

Les résultats obtenus par les méthodes actuelles varient très largement et manquent souvent de cohérence. Ceci est probablement dû à la nature complexe de quelques glucides, tels que la cellulose, les hémicelluloses et les pentosanes. La variété des blés ainsi que les conditions de culture, de récolte et de stockage influencent aussi largement leur composition chimique.

I. — Nature et répartition des différents glucides

1.1. — *Oses et oligosides*

1.11. *Aspect qualitatif*

Les deux principaux oses, identifiés dans le grain de blé, sont le glucose et le fructose. Les autres oligosides connus (maltose, saccharose, raffinose, glucodifructose, néokestose et autres) sont présentés dans le *tableau 1*.

La présence de fructosyl-raffinose dans le blé a été rapportée par MENGER, 1961, WHITE et SECOR, 1953 A, MONTGOMERY et SMITH ,1956 et SAUNDERS, 1970.

TABLEAU I

Constitution de quelques di- et oligosides du grain de blé

Nom	Constitution
Saccharose	α-D-glucopyranosyl-(1→ 2)-β-D-fructofuranose
Maltose	α-D-glucopyranosyl-(1→ 4)-α-D-glucopyranose
Néokestose	β-D-fructofuranosyl-(2→ 6)-α-D-glucopyranosyl-(1→ 2)-β-D-fructofuranose
Raffinose	α-D-galactopyranosyl-(1→ 6)-α-D-glucopyranosyl-(1→ 2)-β-D-fructofuranose
Fructosyl-raffinose	α-D-galactopyranosyl-(1→ 6)-α-D-glucopyranosyl-(1→ 2)-β-D-fructofuranosyl-(1→ 2)-α-D-fructofuranose
Stachyose	α-D-galactopyranosyl-(1→ 6)-α-D-galactopyranosyl-(1→ 6)-α-D-glucopyranosyl-(1→ 2)-β-D-fructofuranose

Récemment, SAUNDERS et WALKER, 1969 et STEVENS, 1970, ont identifié du stachyose dans les cellules d'aleurone du grain de blé. Une fraction glucidique de poids moléculaire relativement plus élevé, appelée glucofructosane et supposée correspondre à la lévosine de TANRET, 1891, a été signalée dans le blé, par les auteurs suivants : COLIN et BEVAL, 1923, KOCH *et al.*, 1951, MACLEOD et PREECE, 1954, MONTGOMERY et SMITH, 1956, ROHRLICH et ESSNER, 1960, TAUFEL *et al.*, 1959, WHITE et SECOR, 1953 B, WILLIAMS et BEVENUE, 1951. Cette dernière fraction est composée d'unités fructose reliées en β 1-2 comme dans l'insuline (SCHULBACH, 1952, MONTGOMERY et SMITH, 1957). Chaque extrémité de chaîne comporte un résidu glucose relié par une liaison α-glucosidique similaire à celle existante dans le saccharose. On suppose à l'heure actuelle que les glucofructosanes sont synthétisés enzymatiquement par le transfert d'un résidu fructose sur un « primer » saccharose (BELL et PALMER, 1952, BOGGS *et al.*, 1952). L'importance des oligosides en fermentation panaire et leur rôle en panification a été largement revue par D'APPOLONIA *et al.*, 1971.

1.12. *Aspect quantitatif*

Il est difficile de rapporter les quantités d'oligosides du grain de blé à maturité, lorsqu'on sait les grandes variations qu'elles peuvent subir selon la variété du blé et les conditions dans lesquelles il a été récolté et même conservé, comme le montrent certains résultats d'analyses (MERCIER *et al.*, 1965, TOLLIER *et al.*, 1968). Bien plus, pour une même variété cultivée la même année et dans des régions différentes, TOLLIER *et al.*, 1968, ont montré que la fraction d'oligosides soluble dans l'éthanol à 80 p. 100 pouvait varier de 2,72 à 3,72 p. 100, teneur rapportée à la matière sèche du blé.

Les résultats obtenus par différents auteurs sans définir la variété de blé étudiée ont été toutefois comparés dans le tableau 2. Excepté la fraction « glucofructosanes » (1,03 p. 100, MAC LEOD et PREECE, 1954), le saccharose est le principal constituant des oligosides; le raffinose et le glucodifructose sont présents en petites quantités; le glucose, le fructose et le maltose à l'état de traces. Cependant, MENGER, 1961, a rapporté 0,18 p. 100 de maltose et une valeur de 0,68 p. 100 pour le

TABLEAU 2

Teneurs en oses et oligosides du grain de blé exprimée en p. 100 de la substance sèche

Glucides éthanolo-solubles totaux	Gluco-fructosanes	Raffinose	Gluco-difructose	Maltose	Saccharose	Glucose	Fructose	Galactose	Références biblio-graphiques
2,76 (1)	1,03	0,33	0,41	traces	0,84	0,09	0,06		Mac Leod (4), 1954
		0,19	0,26	0,04	0,88	—	—	—	Taufel (4), 1959
		0,68		0,18	0,74	0,03		0,02	Menger (4), 1961
				0,05	0,54	0,08	0,08	0,02	Lynch (4), 1962
3,23 (2)	0,94 (3)	0,35		traces	1,55	—		—	Cerning (5), 1970
2,87 (2)	1,14 (3)	0,20			1,40	0,04			Cerning, 1970
3,13 (2) 2,15-3,96									Tollier (6) *et al.*, 1968

(1) Calculé.
(2) Déterminé après extraction éthanolique à chaud.
(3) Valeurs comprenant des traces de fructose libre.
(4) Déterminé par chromatographie.
(5) Déterminé par voie chimique et enzymatique.
(6) Valeurs extrêmes et moyennes de 10 variétés de blé français.

raffinose (ce dernier résultat correspondant à un mélange de raffinose et d'une autre tâche supposée être un fructosyl — raffinose selon son Rf).

Les résultats varient largement selon la technique d'analyse utilisée. Ceux obtenus par chromatographie sur papier sont concordants mais systématiquement plus faibles que les valeurs obtenues par des méthodes chimiques et enzymatiques (CERNING, 1970), en particulier pour la quantité de saccharose. Les résultats de ce dernier auteur ont été obtenus après deux extractions à l'éthanol 80 p. 100 et à l'ébullition.

1.2. — *Amidon*

1.21. *Structure chimique*

L'amidon est le glucide de réserve du blé qui représente 62 à 75 p. 100 de sa matière sèche selon la variété. Il se dépose sous la forme de granules biréfringents et insolubles dans l'eau. C'est un polymère de résidus anhydroglucopyranose reliés entre eux par deux types de liaison α (1-4) et α (1-6) et composé d'une fraction essentiellement linéaire du type α (1-4) appelée amylose et d'une fraction ramifiée, l'amylopectine. Il est généralement accepté que les propriétés des grains d'amidon ne sont pas statiques mais qu'elles changent au cours de la croissance du matériel végétal expliquant vraisemblablement les variations obtenues dans la littérature sur le rapport amylose/amylopectine de l'amidon de blé. BICE *et al.*, 1945, WOOD 1960, ont ainsi montré que la quantité d'iode liée à l'amidon augmentait au cours de la croissance du blé, interprétés par les auteurs comme une augmentation de l'amylose de l'amidon. Ce phénomène pourrait être attribué soit à une augmentation de la taille moléculaire de l'amylose, soit à une diminution du taux de ramification de ce dernier composant (BANKS et GREENWOOD, 1972). Quoiqu'il en soit, le pourcentage apparent de l'amylose dans l'amidon de différents blés à maturité varie entre 23 et 30 p. 100, l'amylopectine étant l'autre constituant majeur. Des traces de matières azotées (0,17 à 0,25 p. 100), lipidiques (0,5 à 1 %) et minérales (0,25 p. 100) peuvent représenter jusqu'à environ 1 p. 100 de l'amidon total (MERCIER, 1968).

Une importante caractéristique de l'amidon de blé à maturité est la présence de deux types de granules, une population de granules larges et lenticulaires (de diamètre compris entre 20 et 35 μ), et une population de petits granules sphériques (de diamètre compris entre 2 et 10 μ) (D'APPOLONIA, 1971, GUILBOT, 1963). Récemment EVERS *et al.*, 1973, 1974, après isolement et purification de l'amidon de deux variétés de blé français, CAPPELLE et KOLIBRI, ont estimé, au moyen d'un appareil de tamisage de laboratoire, à 30 p. 100 la fraction de grain d'amidon dont le diamètre est inférieur à 10 μ et à 70 p. 100, les grains d'amidon à diamètre supérieur à 10 μ. Après avoir fractionné ces deux variétés d'amidon de blé en quatre sous fractions selon le diamètre des grains, ces mêmes auteurs ont étudié le pourcentage d'amylose des fractions obtenues et les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Aucune différence significative n'a pu être observée dans la teneur en amylose des quatre fractions d'amidon et pour les deux types d'amidon étudiés, la variété de blé Kolibri ayant une teneur en amylose (30 p. 100) supérieure à celle des amidons de blé Cappelle (25-27 p. 100).

L'étude des propriétés des fractions amylose et amylopectine d'amidon de deux variétés de blé « Maris Wigeon » (blé à force boulangère) et Cappelle a été effectuée par BANKS et GREENWOOD, 1967, après dispersion des amidons dans le diméthylsulfoxide (tableau 4).

TABLEAU 3

Répartition des grains d'amidon de blé selon leur taille et pourcentage d'amylose des différentes fractions d'amidon

Taille en μ	0-10	10-15	15-20	> 20
Répartition en % :				
— Cappelle 1 . . .	30	11	33	26
— Cappelle 2 . . .	30		70	
% *d'amylose* :				
— Cappelle 1 . . .	25	—	27	28
— Cappelle 2 . . .	26	27	27	27
— Kolibri	30	29	30	28

TABLEAU 4

Propriétés des fractions d'amylose et d'amylopectine des amidons des deux variétés de blé

Fractions	Amylose		Amylopectine	
Variétés	Maris Wigeon	Cappelle	Maris Wigeon	Cappelle
Affinité à l'iode mg I_2 /%	19,3	19,7	0,5	0,6
(β + Z) amylolyse %	99,0	100,0	56,0	55,0
β-amylolyse %	89,0	72,0	56,0	54,0
[η] (ml/g)*	170	330	150	150
Longueur de chaîne			20	21

(*) Détermination par une méthode enzymatique.

TABLEAU 5

Propriétés des fractions « anormales » d'amylose et amylopectine des amidons de deux variétés de blé

Variétés	Amylose « anormale »		Amylopectine « anormale »	
	Maris Wigeon	Cappelle	Maris Wigeon	Cappelle
Affinité à l'iode mg I_2 (%)	11,8	12,5	1,2	0,2
(β + Z) amylolyse %	94,0	97,0	64,0	55,0
β amylolyse %	56,0	66,0	62,0	55,0
[η] ml/g	180,0	185,0	135,0	155,0
Longueur de chaîne			27	25
Quantité en % de l'amidon. . .	4	2	5	4

La précipitation au butanol thymol conduit à l'obtention de deux fractions principales, identifiées, par les auteurs à de l'amylose et de l'amylopectine dite « native ». Soumises à un deuxième fractionnement, soit par la préparation d'un triacétate d'amylose soit par la formation d'un complexe de l'amylopectine avec le thymol, ces derniers auteurs ont pu mettre en évidence la présence de fractions « anormales » d'amylose et d'amylopectine et leurs propriétés figurent dans le tableau 5.

Ces fractions, dont la structure est intermédiaire entre l'amylose et l'amylopectine, ne représentent que 2 à 5 p. 100 de l'amidon.

La structure fine de l'amidon de blé est actuellement étudiée par une méthode enzymatique mettant en œuvre les enzymes spécifiques de la liaison α (1-6), la pullulanase, de la liaison α (1-4), la β-amylase, et des deux types de liaisons, l'amyloglucosidase.

Après déramification par la pullulanase de l'amidon de blé empesé, suivi d'un fractionnement par tamisage moléculaire (Séphadex G-50), Robin *et al.* (1975) ont pu montrer que l'amidon de blé était constitué principalement de 3 populations de chaînes.

La fraction correspondante à des chaînes de degré de polymérisation ($\overline{DP}$) supérieur à 60 représenterait l'amylose et certaines des longues chaînes de l'amylopectine. Les populations de chaînes à $\overline{DP}$ de 45 et de 15-20 correspondraient aux chaînes constitutives de l'amylopectine. Après une hydrolyse acide ménagée (type lintnérisation) des grains d'amidon de blé, la population de chaînes de $\overline{DP}$ voisine de 15-20 est la seule fraction qui s'avère résistante à l'acide. A la lumière de ces résultats, Robin *et al.* (1975) ont proposé un schéma de structure de l'amylopectine de l'amidon de blé, dans lequel la population de chaînes de $\overline{DP}$ de 45 constituerait le squelette de la macromolécule et les chaînes de $\overline{DP}$ de 15 à 20 représenteraient les chaînes externes. Ce schéma, comparé à celui déjà proposé pour l'amidon de pomme de terre (Robin *et al.*, 1974), en diffère par le rapport entre le nombre de chaînes de $\overline{DP}$ 45 et celles de $\overline{DP}$ 15-20.

1.22. *Structure physique*

L'amidon de blé présente un spectre de diffraction aux rayons X, du type A, correspondant au spectre des amidons normaux des céréales. Le spectre indique que la structure de l'amidon comporte des régions plus organisées (cristallines) que d'autres (amorphes). La lintnérisation tend à détruire la fraction amorphe, la partie cristalline étant acido-résistante (Robin *et al.*, 1975). Par contre, soumis à différents traitements mécaniques (Mercier *et al.*, 1968), hydrothermiques (Charbonnière *et al.*, 1973), effectués dans des conditions définies de pression, d'hydratation et de température, le spectre des amidons de blé ainsi traités est modifié, soit par la disparition de la structure cristalline (traitement de pression) soit par l'apparition de nouvelle structure cristalline (cuisson-extrusion).

C'est le développement récent de la microscopie électronique à transmission et à balayage qui a permis de progresser dans la connaissance de l'ultrastructure du grain d'amidon de blé.

Evers (1971), Gallant et Guilbot (1973), ont suivi l'évolution des grains d'amidon dans le caryopse de blé, péricarpe et albumen, au cours de sa maturation.

Des grains d'amidon sphériques apparaissent exclusivement dans les enveloppes du péricarpe et augmentent de taille jusqu'au 4^{e} ou au 5^{e} jour après l'an-

thèse, pour disparaître du péricarpe au 14e jour après l'anthèse. Pendant ce temps, l'albumen s'organise. Les premiers grains d'amidon formés atteignent leur taille maximale vers le 14-15e jour après l'anthèse. Dans le caryopse mature les petits grains demeurent sphériques ou deviennent polygonaux avec un diamètre de l'ordre de 10 μ alors que celui des gros grains lenticulaires est d'environ 35 μ.

EVERS (1971), a observé plus particulièrement, en cours de formation des grains lenticulaires, la présence d'un renflement autour d'un nucleus de 1 à 2 microns. Ce renflement entoure ensuite le noyau et se creuse d'un sillon dans sa partie externe. D'après EVERS et MC DERMOTT, (1970), seuls les grains d'amidon de blé de forme lenticulaire posséderaient ce sillon équatorial; cependant des grains de forme lenticulaire, de dimension moyenne (12 à 15 μ) essentiellement localisés à la couche subaleurone peuvent en être dépourvus.

Ce sillon équatorial serait, selon JENKINS *et al.*, (1974), le site préférentiel de la formation de l'amidon dans le plastide. En effet, ces auteurs ont observé sur des sections de plastides fixées à l'osmium glutaraldéhyde, la présence d'un réticulum de tubules dans le sillon équatorial du grain d'amidon. De plus, dès les premiers stades du développement du grain, la structure de l'amidon en couches concentriques a pu être mise en évidence.

A maturité, l'état de surface des grains d'amidon est observé directement par microscopie à balayage tandis que l'étude de la structure interne est généralement effectuée après hydrolyse acide et enzymatique partielle. L'amidon de blé d'aspect lenticulaire est constitué de couches superposées à la manière d'assiettes qui seraient accolées bord à bord. Après un traitement de lintnérisation (HCL, 2,2 N, pendant 8 mois à température ambiante) GALLANT et GUILBOT, (1973), ont montré qu'une partie de ces couches était hydrolysée alors que la partie centrale du grain était acido-résistante. En périphérie, on observe un resserrement des couches résiduelles, certaines d'entre elles pouvant avoir moins de 0,1 micron d'épaisseur. Ces couches résistantes à l'acide chlorhydrique correspondent d'après ROBIN *et al.*, (1975), aux chaînes externes de l'amylopectine.

Après une hydrolyse partielle à l'α-amylase du blé, (GALLANT et GUILBOT, 1973), au suc pancréatique (GALLANT *et al.*, 1973), à l'α-amylase bactérienne (GALLANT *et al.*, 1972) le mode d'attaque est sensiblement différent. L'hydrolyse de l'amidon commence par une exo corrosion, suivie d'une endo corrosion du sillon équatorial où des pores se creusent très profondément, et s'étendent dans le sens tangentiel, en formant de larges entonnoirs. Après une hydrolyse plus prolongée, on assiste à un découpage des couches superposées et à la solubilisation de la partie moyenne du grain.

Des couches résiduelles de 800 à 1 400 A⁰ d'épaisseur ont été observées. Comme dans le cas de l'attaque acide, un noyau central plus résistant se dégage de l'ensemble de ces couches restantes. Les amylases du blé, pancréatique et bactérienne montrent une grande similitude dans leur mode d'action. Par contre, la glucoamylase fongique attaque toute la surface du grain d'amidon sans donner de préférence au sillon équatorial (EVERS *et al.*, 1971).

Ces différentes observations ont permis à GALLANT et GUILBOT, (1973), de compléter et de préciser le diagramme tridimensionnel schématisant l'ultrastructure du grain d'amidon du blé publiée en 1962 par BUTTROSE.

En cours de maturation, le grain d'amidon est formé d'un noyau dense, arrondi et excentré, entouré d'une substance moins organisée qui s'étend dans la partie équatoriale du grain. A maturité le noyau est plus central, en forme de lentille aplatie et entourée de couches concentriques dont chacune présente un sillon équatorial.

1.23. *Propriétés de gélatinisation et de solubilité*

Les grains d'amidon de blé à l'état sec gonflent lorsqu'ils sont dispersés dans l'eau froide tout en restant insolubles et le diamètre des grains lenticulaires augmente approximativement de 30 p. 100 (HANSSEN, DODT et NIEWMANN, 1955). En chauffant la suspension, les grains d'amidon continuent à gonfler; ils conservent leurs propriétés optiques et le gonflement est réversible jusqu'au moment où les grains commencent à perdre leur biréfringence. Lorsqu'ils ont perdu toutes leurs propriétés optiques, les grains d'amidon de blé sont « empesés » ou « gélatinisés ». Une observation extrêmement intéressante a été rapportée récemment par GOUGH et PYBUS (1971). Ces auteurs ont noté, en conservant une suspension d'amidon de blé à une température inférieure à celle de gélatinisation (50 °C) pendant 72 h, l'altération des grains. Bien que les grains traités conservent leurs propriétés optiques et leur spectre A, et ne deviennent que faiblement plus sensibles à l'α-amylase de *Bacillus subtilis*, ces grains gonflent et deviennent plus perméables à de grosses molécules de colorants. De plus, la zone de température de gélatinisation des grains traités est plus étroite (65,4-65,8 °C) et nettement plus élevée que celle des grains d'amidon natif (52-61 °C). Ces résultats amènent à penser à une modification de la structure interne du granule que les auteurs expliquent par le comportement d'un polymère semi-cristallin dont les températures de cristallisation et de fusion augmentent parallèlement. Au cours du traitement à la chaleur du grain d'amidon, la température de fusion serait augmentée, entraînant la réduction de la gamme de température dans laquelle la fusion s'effectue. Puisque dans le phénomène de gélatinisation, la fraction cristalline est détruite, les auteurs font une analogie entre la fusion d'un polymère semi-cristallin et la gélatinisation des grains d'amidon. La gélatinisation de l'amidon est aussi influencée par la présence de sels. GOUGH et PYBUS (1973), ont étudié la gélatinisation de l'amidon de blé en présence de chlorure de calcium, de cuivre et d'aluminium. Les allures des courbes de gélatinisation sont similaires pour les 3 sels étudiés. La température de gélatinisation augmente initialement avec la concentration en sel, atteint un maximum, diminue pour passer par un minimum et finalement augmente à nouveau. Les auteurs supposent qu'à une faible concentration en sel, l'eau est le principal responsable dans le gonflement du grain; son activité étant réduite par la présence de sels, des températures plus élevées sont nécessaires pour induire la gélatinisation. A chaque étape, un certain type de gélatinisation est observé entraînant soit un gonflement tangentiel du grain avec ou sans perte de biréfringence, soit une dispersion apparente du grain.

Les propriétés de solubilité et de gélatinisation des grains d'amidon selon leur taille ont été étudiées récemment par KULP (1973). Par turboséparation, l'auteur a fractionné les petits grains d'amidon des grains réguliers à partir de blés tendres et de blés d'hiver. La solubilité des petits grains d'amidon est généralement inférieure à celle des grains réguliers; par contre, leur zone de température de gélatinisation, leur capacité d'absorption d'eau et leur susceptibilité aux enzymes sont supérieures à celles des grains de taille normale.

Ces phénomènes de solubilité et de gélatinisation de l'amidon jouent un rôle important en technologie alimentaire, en particulier en panification, biscuiterie, biscotterie, aliments infantiles. Ainsi KULP (1973), a montré que des pâtes préparées à partir de petits grains d'amidon et de gluten, sont moins stables que celles à base de grains réguliers, ce qui se traduit par un volume de pain et une qualité inférieure à ceux obtenus avec des pâtes à base de grains d'amidon normaux.

Ces observations confirment l'importance de l'amidon en panification et en biscuiterie sèche qui selon GREENWOOD (1972), a souvent été sous estimée.

La propriété que possède l'amidon gélatinisé ou « empesé » à précipiter au cours de sa conservation, rapidement au froid, plus lentement à température ordinaire, correspond au phénomène de « rétrogradation », qui intervient en technologie de panification, au cours du rassissement du pain.

1.24. *Aspect quantitatif*

Les méthodes de dosage de l'amidon sont nombreuses et nous ne citerons que les références récentes (BANKS *et al.*, 1970; BONDARENKO et SMIRNOV, 1966; LIBBY, 1970; MEUSER et KEMPF, 1970; RICHTER et SCHIERBAUM, 1968; SALO et SALMI, 1968; SMIRNOV *et al.*, 1966; THIVEND *et al.*, 1965, 1972; THOMAS et WINKLER, 1968; WINKLER et LUCKOW, 1967). Elles diffèrent essentiellement par le mode de dispersion de l'amidon, empesage, action de certains acides (chlorhydrique, perchlorique) action de certains sels (chlorure de calcium, carbonate de calcium) et par la détermination de l'amidon dispersé. Cette détermination s'effectue soit par mesure du pouvoir rotatoire de l'amidon solubilisé, après défécation, soit par l'utilisation de l'action saccharifiante des amylases végétales (malt) ou animales (salivaires, pancréatiques) et dosage du pouvoir réducteur, soit par isolement de l'amidon sous forme de son complexe avec l'iode.

Comme ces méthodes ne sont pas spécifiques de l'amidon, la teneur en amidon des différents blés trouvés dans la littérature doit être considérée avec réserve.

La mise au point d'une méthode enzymatique utilisant successivement l'action spécifique de la glucoamylase et de la glucose oxydase (THIVEND *et al.*, 1965, 1972) permet de déterminer spécifiquement l'amidon dans un milieu complexe tel que le blé.

Le tableau 6, rapporte les teneurs en amidon de différents blés d'origine américaine et européenne.

TABLEAU 6

Teneur en polyholosides du grain de blé exprimée en p. 100 de la substance sèche

Amidon	Matières Cellulosiques	Pentosanes	Références Bibliographiques
66,3	2,51	7,94	Neumann-Pelshenke, 1954
62-68	2,60	8-9	Guilbot, 1963
68,8			Thivend et al., 1965
62,9-71,8	1,98-3,02		Pomeranz et Mac Masters, 1968
63,4-75,0		5,57-7,40	Tollier *et al.*, 1968 (1)
69,2		6,50	
67,0	1,7	8,2	Salo et Kotilainen, 1970
67,2	1,9	7,1	Cerning, 1970
68,4	1,8	5,7	Cerning, 1970
65,3		6,0	D'Appolonia *et al.*, 1971

(1) Valeurs extrêmes et moyennes de 10 variétés de blés français.

En général, la teneur en amidon du grain de blé semble être en rapport inverse avec son taux de protéines (HOPKINS et GRAHAM, 1935), ainsi les variétés de blé européennes ont une teneur en amidon relativement élevée (62,0 à 75,0 p.100) et un taux protéique plus faible.

Les variétés américaines contiennent de 61,2 à 71,9 p. 100 d'amidon. TOLLIER *et al.* (1968) ont étudié l'influence des conditions de culture sur la composition chimique de 10 variétés de blé, cultivées la même année dans 3 régions différentes de la France. Les résultats montrent que la teneur en amidon d'une même variété cultivée dans différents lieux varie de 71.4 à 75 p. 100. La différence observée est significative car ces analyses ont été effectuées par la même méthode enzymatique et dans le même laboratoire.

1.3. — *Cellulose, Hémicelluloses et Pentosanes*

1.31. *Cellulose*

La cellulose est un β-D-glucane composée de résidus anhydroglucopyranose reliés en β-1-4.

C'est le principal polyholoside de structure de toutes les plantes et sa constitution semble indépendante de l'origine de la plante (POLGLASE, 1955). La cellulose est un polymère qui, excepté les différences dans son poids moléculaire, est une substance chimique uniforme. Dans le blé, il représente une large part « des matières cellulosiques brutes ».

Bien que de nos jours la présence ou non de cellulose en alimentation humaine soit assez controversée, elle est généralement considérée comme indésirable dans les produits dérivés du blé. Les procédés modernes de mouture réduisent au minimum le taux de « matières cellulosiques brutes » de la farine; cependant, les sous produits de mouture en contiennent de grandes quantités.

La détermination quantitative des « matières cellulosiques brutes » est effectuée par différentes méthodes (A.A.C.C. 32-15, 32-17, 1962; GUILLEMET et PRECEPTIS, 1942; LINDNER, 1969; procédé de SCHARRER-KURSCHNER et WEENDE, décrit par ROTHE *et al.*, 1968, TOLLIER. 1972) basées sur des procédés soit d'hydrolyse soit d'oxydation. Dans les techniques d'hydrolyse (méthode de WEENDE, A.A.C.C. 1962), utilisant une concentration connue d'acide et d'alcali, les composants facilement hydrolysables sont dégradés en substances solubles; la fraction de cellulose résistant au traitement dépendant du taux d'hydrolyse. Une certaine quantité de lignine et de pentosanes se retrouve dans le résidu. Dans les procédés d'oxydation et de nitration, l'action de l'acide nitrique fumant détruit les constituants de la paroi cellulaire, les pentosanes sont solubilisés et la lignine est oxydée (ROTHE *et al.*, 1968). Cette technique est souvent utilisée pour la détermination de la cellulose vraie et non des « matières cellulosiques brutes », parce que la cellulose semble être mieux séparée de son matériel associé (TUNGER, 1964). La méthode de SCHARRER-KÜRSCHNER dose par défaut (12 p. 100) le taux de cellulose vraie (TUNGER, 1964, THOMAS, 1972). De plus ces 2 méthodes (SCHARRER-KÜRSCHNER et WEENDE) ne sont pas satisfaisantes quant à la reproductibilité des résultats (ROTHE, 1972). Les différences en valeur relative obtenues pour des échantillons à teneur en matières cellulosiques brutes élevée (1,75 à 9,44 % en matière sèche), sont de 6 à 12 p. 100 pour les 2 méthodes. Pour des échantillons à faible teneur en matières cellulosiques brutes (0,2 à 1 p. 100 en matière sèche), la méthode de SCHARRER-KÜRSCHNER montre des différences de 7,7 à 28,6 p. 100 et celle de WEENDE des différences encore plus élevées de 25,5 à 47,7 p. 100.

Des essais ont été entrepris pour développer des méthodes enzymatiques; ces dernières ne dégradant pas les pentosanes et les lignines, fournissent des résultats 2 à 5 fois supérieurs à ceux obtenus par les méthodes chimiques (THOMAS, 1972). Les techniques proposées sont longues et ne sont pas adaptées pour l'utilisation en série, cependant elles conduisent à une bonne estimation des constituants totaux et non digestibles de la paroi cellulaire. Ces remarques générales permettent vraisemblablement d'expliquer les taux variables de « matières cellulosiques brutes » cités dans la littérature.

Le tableau 6 indique le taux de « matières cellulosiques brutes » de divers échantillons de blé, probablement déterminé par la technique d'hydrolyse. Pour les blés américains, le taux de « matières cellulosiques brutes » varie de 1,98 à 3,02 p. 100, tandis que les valeurs obtenues pour les variétés européennes sont comprises entre 1,71 et 2,6 p. 100. En supposant que la même technique de détermination de la cellulose a été utilisée, les variations sont significatives.

Les résultats obtenus, avec différentes méthodes pour un même échantillon, varient trop largement pour tenter une comparaison. Ainsi, THOMAS (1972), a rapporté, pour un même échantillon de blé, un taux de « matières cellulosiques brutes » de 2,4 p. 100 pour la méthode de WEENDE, de 1,8 p. 100 par la technique de SCHARRER-KURSCHNER et de 8,5 p. 100 par une méthode enzymatique.

1.32. *Hémicelluloses et Pentosanes*

La définition des hémicelluloses et des pentosanes est difficile principalement parce qu'ils correspondent à des polymères glucidiques dont l'ose est différent ainsi que le type de liaison qui les relie. De plus, ces glucides diffèrent dans le blé et les autres céréales des parois cellulaires des autres plantes, car certains sont hydrosolubles, correspondant de 20 à 25 p. 100 de la fraction totale. Généralement, le terme d'« hémicelluloses » est appliqué aux glucides insolubles dans l'eau, tandis que la fraction soluble est appelée pentosanes. Cependant, ASPINALL (1959), fait remarquer l'imprécision de cette classification basée sur la solubilité, lorsqu'on se refère à leur structure chimique et leur valeur biologique. Malgré ces définitions, les résultats rapportés dans la littérature, sous le terme de pentosanes, concernent dans la majorité des cas, les deux fractions solubles et insolubles.

La fraction « hémicelluloses » du blé est essentiellement composée d'arabinose et de xylose. Suivant leur origine histologique, ils diffèrent par la présence d'autres constituants mineurs (glucose, galactose, acides polyuroniques et protéines). Les études de méthylation de l'hémicellulose du son (ADAM, 1955) ont indiqué que le glucide est une macromolécule fortement branchée. Après élimination de l'arabinose par une hydrolyse acide douce, un glucide acide est obtenu (SCHMORAK *et al.*, 1957). Le xylane restant est composé de résidus anhydro-1-xylopyranoside reliés en β 1-4. Les acides glucuroniques sont reliés au squelette du xylane par une liaison glycosidique en 1-2.

Les hémicelluloses de l'endosperme ont été étudiées après extraction de la farine par l'eau, élimination de l'amidon et purification du matériel mucilagineux restant, appelé « amylodextrine » (SANDSTEDT *et al.*, 1939), « squeege » (CLENDENNING et WRIGHT, 1950), « tailings » (MACMASTERS et HILBERT, 1944) ou « sludge » (MEDCALF *et al.*, 1968). L'examen de cette fraction après hydrolyse acide et chromatographie de l'hydrolysat révèle, comme constituants principaux du D-xylose (59 p. 100) et du L-arabinose (39 p. 100). Des traces de glucose ont été

observées (2 p. 100). Les hémicelluloses du son contiennent en plus 9 p. 100 d'acide glucuronique, mais pas de glucose.

Cole (1967), a séparé les hémicelluloses des « tailings » par fractionnement sur diéthylaminoéthyl cellulose (D.E.A.E. cellulose) et a obtenu 5 fractions contenant du xylose, de l'arabinose et du glucose. De plus, les fractions 4 et 5 ont révélé la présence du galactose et seule la fraction 5 contenait des protéines.

Cette observation est en accord avec celle de Upton et Hester (1966). Selon Medcalf *et al.*, (1968), les hémicelluloses de blé dur contiendraient une proportion plus élevée d'arabinose, indiquant une structure plus fortement ramifiée. Les mêmes auteurs soulignent que la différence majeure entre la fraction hémicelluloses et les pentosanes est le poids moléculaire plus élevé de la fraction insoluble. Antérieurement, Montgomery et Smith (1955 A, 1955 B), avaient suggéré que les pentosanes du blé, solubles dans l'eau, pourraient être moins branchés que les hémicelluloses. Les pentosanes solubles dans l'eau peuvent être obtenus par extraction aqueuse de la farine, avec d'autres composés solubles. Kundig *et al.*, (1961A), et Pence *et al.*, (1950), ont décrit en détail les procédés d'extraction et de purification. Kulp (1968) et Perlin (1951), ont étudié la structure des pentosanes solubles et indiqué qu'ils étaient formés d'une chaîne linéaire de xylanes, constituant le squelette, à laquelle des chaînes latérales d'un résidu arabinose étaient attachées, formant ainsi un arabinoxylane. Les résidus anhydro-D-xylopyranosyl sont linéairement reliés par des liaisons β 1-4, auxquels les résidus anhydro-D-arabinofuranosyl sont attachés en position 2 et 3 aux résidus anhydroxylose. Les résidus arabinose empêchent probablement l'association des chaînes linéaires de xylanes, conduisant ainsi à un produit soluble dans l'eau. Les pentosanes solubles contiennent en plus des unités pentose, de petites quantités de protéines et quelquefois du galactose et du glucose. En général, la description des pentosanes par les différents auteurs concordent. Cependant, la composition chimique, les proportions des constituants et les propriétés technologiques dépendent des procédés d'extraction et de panification (Gilles et Smith, 1956, Meredith, 1957).

Kundig *et al.*, (1961 A), ont fractionné les pentosanes solubles par chromatographie sur D.E.A.E. cellulose et ont montré l'hétérogénéité et la nature complexe de ces glucides, confirmant ainsi les résultats de Perlin (1951). Les pentosanes ont la remarquable propriété de gélifier par un phénomène d'oxydation dans lequel les glycoprotéines et l'acide férulique semblent être impliqués (Fausch *et al.*, 1963, Neukom et Kundig 1962 A, 1962 B, Neukom *et al.*, 1967 B).

Neukom *et al.*, (1957 A), ont aussi séparé la fraction glycoprotéine en 2 parties, par action d'une pronase (enzyme protéolytique de *Streptomyces griseus*). Leurs résultats indiquent que le galactose n'est pas branché directement à la chaîne de xylane, mais qu'un arabinogalactane est joint par un pont polypeptide à l'arabinose de l'arabinoxylane.

Les hémicelluloses et les pentosanes ont certains effets en technologie des céréales, spécialement en meunerie, amidonnerie et panification. Wolf *et al.*, (1952), ont observé que les zones les plus externes de l'albumen amylacé contenaient plus d'hémicelluloses que le centre, mais aucune corrélation directe n'a été trouvée entre les pentosanes extraits par un acide dilué et les propriétés de mouture (Elder *et al.*, 1953). Selon Loska *et al.* (1949), une faible quantité de pentosanes est généralement associée à des traces de matières minérales.

Les hémicelluloses, et en particulier les fractions « tailings » de la farine, sont associés en amidonnerie du blé, aux produits impurs. Simpson (1955), a indiqué que l'utilisation des pentosanases bactériennes améliorait la purification de l'amidon de blé.

A cause de leurs propriétés hydrophiles, le rôle des pentosanes dans le pain et la pâte a été largement étudié. D'APPOLONIA, (1971) et JELACA et HLYNKA (1972), ont spécialement examiné l'effet des pentosanes de la farine de blé dans la pâte, le gluten et le pain.

Le tableau 6 rapporte les quantités totales de pentosanes de variétés de blé européennes et américaines. Les valeurs obtenues pour les variétés européennes (5,57 à 9 %) varient largement. Les résultats rapportés sur 10 variétés de blé français, cultivées la même année, montrent non seulement que le taux de pentosanes diffère d'une variété à l'autre, mais aussi (TOLLIER *et al.*, 1968), que la quantité de pentosanes d'une même variété, cultivée la même année dans 3 régions différentes peut varier de 5,8 à 6,6 p. 100.

II. — Localisation histologique des différents glucides

Deux méthodes ont été utilisées pour étudier la distribution des glucides dans le grain de blé; l'analyse des produits de mouture et l'analyse des parties morphologiques du grain obtenues par dissection manuelle ou mécanique.

Les produits de la mouture commerciale ne correspondent pas exactement aux fractions morphologiques du grain, mais conduisent à un mélange de ces derniers. En conséquence, les résultats analytiques ne donnent qu'une indication approximative de la composition glucidique. Une image plus précise de cette distribution dans la structure anatomique du grain est obtenue par analyse après dissection des parties morphologiques du grain, mais ce procédé est très long. Les quelques résultats rapportés ci-après ont été obtenus par cette dernière technique.

2.1. — *Le péricarpe*

D'un point de vue histologique, le péricarpe comprend l'épiderme, l'hypoderme, les cellules tubulaires et les cellules transversales.

Puisque les membranes externes de la graine (composées du testa, des couches hyaline et d'aleurone) sont associées au péricarpe, la plupart des informations obtenues, en particulier celles concernant les divers glucides identifiés, se rapportent aux tissus des couches les plus externes.

Le saccharose, raffinose, néokestose, stachyose et fructosylraffinose ont été trouvés dans la couche d'aleurone (STEVENS, 1970) et le son du blé (SAUNDERS et WALKER, 1969). Dans la couche d'aleurone, les oses, maltose et oligosides, présents dans les autres parties du grain, sont absents (STEVENS, 1970).

Un travail remarquable sur les fractions morphologiques du grain de blé disséqué manuellement, a été effectué par BRÜCKNER (1966). Cet auteur a analysé séparément le péricarpe et les tissus les plus externes du blé en leur teneur respective en « matière cellulosique brute », celluloses et pentosanes (tableau 7).

Parmi les différentes parties qui composent le péricarpe, l'épiderme et l'hypoderme sont plus riches en pentosanes et en « matières cellulosiques brutes » que la couche intermédiaire et les cellules tubulaires. Le péricarpe a une teneur plus élevée en pentosanes que le tégument séminal mais la différence dans le taux de « matières cellulosiques brutes » est particulièrement importante. Celui du péri-

TABLEAU 7

Teneurs en glucides du péricarpe et des couches tégumentaires du grain de blé exprimées en p. 100 de la substance sèche

	Cellulose vraie	Matières cellulosiques	Pentosanes	Références bibliographiques
Péricarpe (Fruit)	30,4	26,5	47,9	Brückner, 1966
		25,0-30,0	30,0-40,0	Guillemet et Guilbot, 1945
Épicarpe (cellules longitudinales)	32,1	27,0	50,1	Brückner, 1966
Mésocarpe (cellules transversales)				Brückner, 1966
Endocarpe (cellules tubulaires)	22,9	20,7	38,9	
Testa (tégument séminal)	0	1,3	34,5	Brückner, 1966
Péricarpe et testa	27,0	23,9	46,6	Brückner, 1966
Assise protéique et Bande hyaline	5,1	6,6	28,6	Brückner, 1966
Couche aleurone — (épiderme du nucelle)		6,0	30,4	Guillemet et Guilbot, 1945

carpe est de 26,6 p. 100 alors que le tégument séminal n'en contient que 1,3 p. 100. La somme des glucides de structure provenant du péricarpe et du tégument séminal est d'environ 71 p. 100. Les couches d'aleurone et d'hyaline contiennent beaucoup plus de pentosanes totaux (28,1 p. 100 BRÜCKNER, 1966; 30,35 p. 100 GUILLEMET et GUILBOT, 1945) que de « matières cellulosiques brutes ». D'après STEVENS (1970), ces dernières fractions renferment 15 p. 100 des oses et oligosides exprimés en glucose.

2.2. — *L'Albumen amylacé*

Les quelques études réalisées sur la détermination des glucides de l'endosperme de blé, disséqué manuellement et qui représente 82 à 83 p. 100 du grain de blé total, sont rapportées dans le tableau 8.

TABLEAU 8

Composition en glucides de l'albumen exprimée en p. 100 de la substance sèche

Amidon	Matières Cellulosiques	Pentosanes	Sucres	Références bibliographiques
78,0-83,0	traces	2,0-3,0	0,1-0,15 (1) 0,1-0,2 (2) 0,6-0,8 (3)	Guilbot, 1963
78,1-83,8	0,2-0,3	3,0-3,5		Bruckner, 1966

(1) Sucres réducteurs.
(2) Saccharose.
(3) Lévosine.

Les « matières cellulosiques brutes » ne sont présentes qu'en petite quantité et les résultats des 2 auteurs (BRUCKNER, 1966; GUILBOT, 1963) ainsi que ceux obtenus sur les teneurs en amidon et en pentosanes sont en parfait accord. La teneur en glucides solubles de l'endosperme (de 0,8 à 1,15 %) n'a été rapporté que par GUILBOT (1963). Une analyse plus détaillée indique 0,1 à 0,15 p. 100 d'oligosides réducteurs, 0,1 à 0,2 p. 100 de saccharose et 0,6 à 0,8 p. 100 d'oligosides. On peut supposer que ces oligosides sont le raffinose aussi bien que les dérivés du fructose, puisqu'ils sont aussi présents dans une farine à très faible taux d'extraction.

2.3. — *Le germe*

Le tableau 9 rapporte les oligosides présents dans la fraction embryonnaire et le scutellum obtenu par dissection manuelle (DUBOIS *et al.*, 1960) et qui représente respectivement 1,25 et 1,29 p. 100 de la matière sèche du grain de blé. Exprimée par rapport à la matière sèche délipidée, la teneur en oligosides de la fraction embryonnaire est de 21 p. 100 et celle du scutellum de 18,4, soit 20,1 de l'embryon total.

Le saccharose est l'oligoside le plus important dans les 2 parties de l'embryon (54,7 à 58,5 p. 100 ainsi que le raffinose (38 à 45,3 p. 100. Ces proportions ont aussi été trouvées dans des germes de maïs disséqués manuellement, ce qui semble être la distribution générale de ces oligosides dans l'embryon (CERNING, 1969). GUILBOT (1963), a observé des traces de fructose, glucose et mélibiose tandis que DUBOIS (1960), n'indique que des traces de glucose.

TABLEAU 9

Composition en oses et oligosides du germe de blé délipide (1)

	Embryon	Scutellum	Scutellum + embryon (par sommation)
Sucres totaux.	21,9	18,4	20,1
Proportion relative . . .			
Saccharose	54,7	62,0	58,5
Raffinose	45,3	38,0	41,5
Fructose			
Glucose	traces	traces	traces
Melibiose			

(1) Résultats de DUBOIS *et al.* (1960) exprimés par rapport au germe délipidé. La teneur en lipides du germe était 27,9 %.

III. — Évolution de la composition glucidique au cours de la maturation

Les travaux réalisés dans le domaine de l'évolution des glucides au cours du développement des grains de blé ne sont pas nombreux.

Les études plus anciennes ont porté essentiellement sur l'évolution de l'ami-

don dans le grain (BRENCHLEY, 1909 A; BRENCHLEY et HALL, 1909 B; THATCHER, 1913; THATCHER, 1915; PERCIVAL, 1921; BELVAL, 1924).

Le laboratoire de Biochimie et Physicochimie des céréales de l'I.N.R.A., a entrepris en 1950 une étude sur l'évolution du contenu de grain de blé de la fécondation à la maturité. Les résultats obtenus, lorsqu'ils sont exprimés par rapport à la substance sèche, montrent une croissance lente presque régulière mais non linéaire de l'amidon, une diminution de la teneur en pentosanes tout au début, puis une augmentation de ceux-ci. Le pourcentage de cellulose par contre, augmente après une première chute légère en deux étapes, diminue et puis s'accroît de nouveau. Le saccharose présente un important maximum au début, et après une diminution rapide, un deuxième moins accentué. Les glucofructosanes suivent globalement la même allure que le saccharose. La quantité de sucres réducteurs diminue assez régulièrement pendant toute la période étudiée.

Cependant l'intérêt principal de ce travail réside dans le mode d'expression des résultats également par rapport à une unité qui est le grain, ce qui permet en effet de donner une image plus réelle de la physiologie des grains. Représentés par rapport au poids de mille grains secs, les résultats sont alors les suivants : le poids sec, l'amidon et les pentosanes évoluent selon une courbe sigmoïde typique, la quantité de sucres réducteurs reste sensiblement constante. Par contre, le saccharose et les glucofructosanes montrent tous les deux un maximum vers le vingt-deuxième jour, après la fécondation. Le saccharose passe par un deuxième maximum vers le trente-cinquième jour et diminue ensuite alors que les glucofructosanes décroissent régulièrement jusqu'à la maturité où leur teneur est égale à celle du saccharose.

Les travaux de MENGER, 1961, montrent que le fructosylraffinose, maltose, saccharose, glucose, et fructose sont présents dans le grain de blé durum dès le début de sa formation et que seule leur concentration évolue en cours de maturation. JENKINS *et al.*, 1974, observent une grande fluctuation de la teneur en matière sèche et en amidon du blé, qu'ils expliquent par des variations d'activités amylasiques.

CERNING et GUILBOT, 1972-1975, ont étudié l'évolution des polyholosides de réserve et de structure et des principaux oses et oligosides au cours du développement de deux variétés de blé cultivées dans des régions différentes.

Les échantillons ont été prélevés dans les champs à partir du huitième jour et jusqu'au quarante-deuxième jour après la floraison. Au moment de chaque prélèvement les épis sitôt coupés ont été immergés dans l'azote liquide, lyophilisés et broyés au Bühler en présence de neige carbonique. Les résultats exprimés par rapport à la matière sèche sont résumés dans le tableau 10 et ils indiquent que la synthèse des glucides est terminée 31 jours après la floraison.

Toutefois, aucune conclusion ne peut être tirée en ce qui concerne la physiologie du grain, lorsque les résultats sont exprimés par rapport à la matière sèche en raison de l'évolution incessante de celle-ci; en effet quelques constituants montrent un accroissement apparent simplement parce que l'accumulation de l'amidon est importante et rapide. Ce phénomène n'a pas toujours été pris en considération, et explique les divergences relevées dans la littérature, qui dans certains cas peuvent conduirent à des conclusions erronées.

Pour obtenir une image réelle de l'évolution qui se produit dans le grain pendant sa maturation, il faut rapporter les résultats analytiques à l'organe en cours de formation. Les résultats de cette étude ne sont pas comme d'habitude, présentés en fonction du temps mais en fonction d'un facteur climatique : la somme des températures moyennes journalières cumulées depuis la floraison (Σtm ^{0}C).

TABLEAU 10

Blé cappelle

Jours après la floraison	tm = °C	Poids de 1 000 grains	Composition glucidique exprimée en % de la substance sèche								
			Amidon (1)	Pento-sanes	Matières cellulo-siques (2)	Glucides éthanolo-solubles totaux (3)	Glucose (1)	Saccharose (1)	Fructo-sanes Fructose (3)	Raffinose (1)	Fraction « X » (4)
8	100	3,9	23,5	5,32	2,76	45,20	3,88	8,02	25,28	—	8,02
12	190	9,2	34,2	7,26	2,49	37,60	1,78	12,18	14,22	—	9,42
15	240	17,2	43,6	7,48	2,59	18,70	0,72	6,65	5,75	—	5,58
19	330	20,6	53,2	7,82	1,88	12,16	0,79	4,54	5,41	—	1,42
21	405	27,0	64,9	6,81	1,50	7,78	0,37	3,96	3,00	—	0,45
24	460	32,4	63,8	6,62	1,52	6,44	0,24	2,77	2,10	—	1,33
27	545	37,6	64,6	6,04	2,14	5,06	0,12	3,08	1,04	—	0,82
31	605	42,8	67,1	6,10	1,85	4,58	0,05	2,32	1,38	0,07	0,76
34	705	43,8	68,5	5,74	1,71	3,54	0,02	1,74	0,94	0,23	0,61
38	795	43,1	66,4	5,94	1,63	2,95	0,02	1,64	0,92	0,31	0,06
42	880	42,5	68,4	5,74	1,80	3,23	—	1,55	0,94	0,35	0,39

(1) Déterminé par voie enzymatique.
(2) Déterminé par la méthode de Weende.
(3) Déterminé par la méthode de l'anthrone.
(4) Obtenu par calcul : glucides éthanolo-solubles totaux — (glucose + saccharose + Raffinose + Fructose + Fructosanes).

Ainsi il est possible de comparer non seulement une céréale cultivée d'une année à l'autre en un même lieu, mais aussi diverses céréales entre elles provenant de différents lieux de culture.

La figure 1 représente pour un blé l'évolution du poids sec des grains (1) et de l'eau (2) en fonction de Σtm °C. Elle comporte également le pourcentage d'eau des grains au moment du prélèvement, car c'est à partir de cette courbe (3) et de celle du poids sec (1) que la quantité d'eau contenue dans le grain frais a été calculée.

Même si cette figure ne semble pas être en relation directe avec la composition glucidique des grains, elle est représentée étant donné qu'il s'agit là d'une courbe

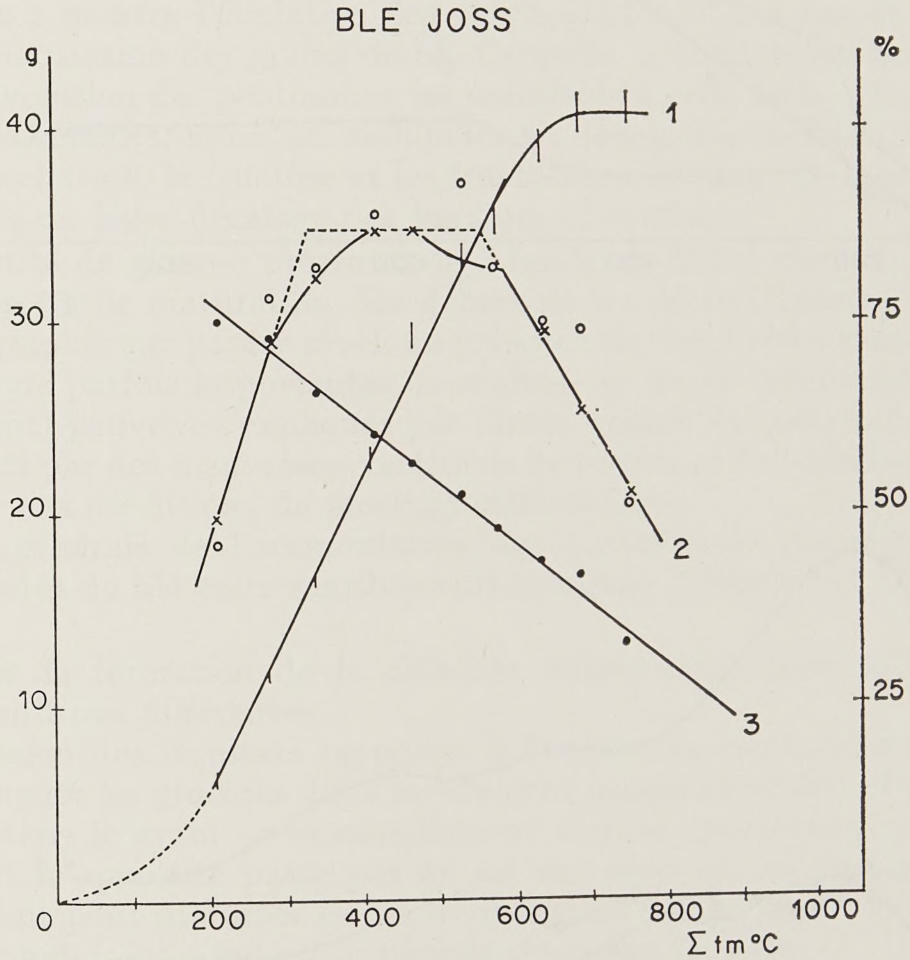


FIG. 1. — *Évolution de la matière sèche (1), de l'eau (2) exprimée en grammes pour 1 000 grains et de la teneur en eau des grains au moment du prélèvement (3) en fonction de Σtm °C.*

Ordonnée gauche : g/1 000 grains.
Ordonnée droite : teneur en eau en p. 100.

de croissance typique d'un blé, (GESLIN et JONARD, 1948) et aussi comme nous le verrons plus tard, les évolutions les plus importantes dans le grain ont lieu pendant la période du palier de l'eau. On voit dans une première phase l'eau augmenter régulièrement et rapidement, sa quantité se maintient stable pendant 12 jours, et on observe ensuite une dessiccation rapide du grain suivant une loi pour ainsi dire linéaire. Il convient ici de discuter brièvement l'aspect du palier de cette courbe qui est tracée d'une part en pointillés et d'autre part en trait continu; ce dernier tracé tient compte des chiffres expérimentaux; la partie en pointillés par contre représente le palier d'eau théorique obtenu par extrapolation des parties linéaires initiales et finales de cette courbe et en répérant une autre section avec le plateau expérimental.

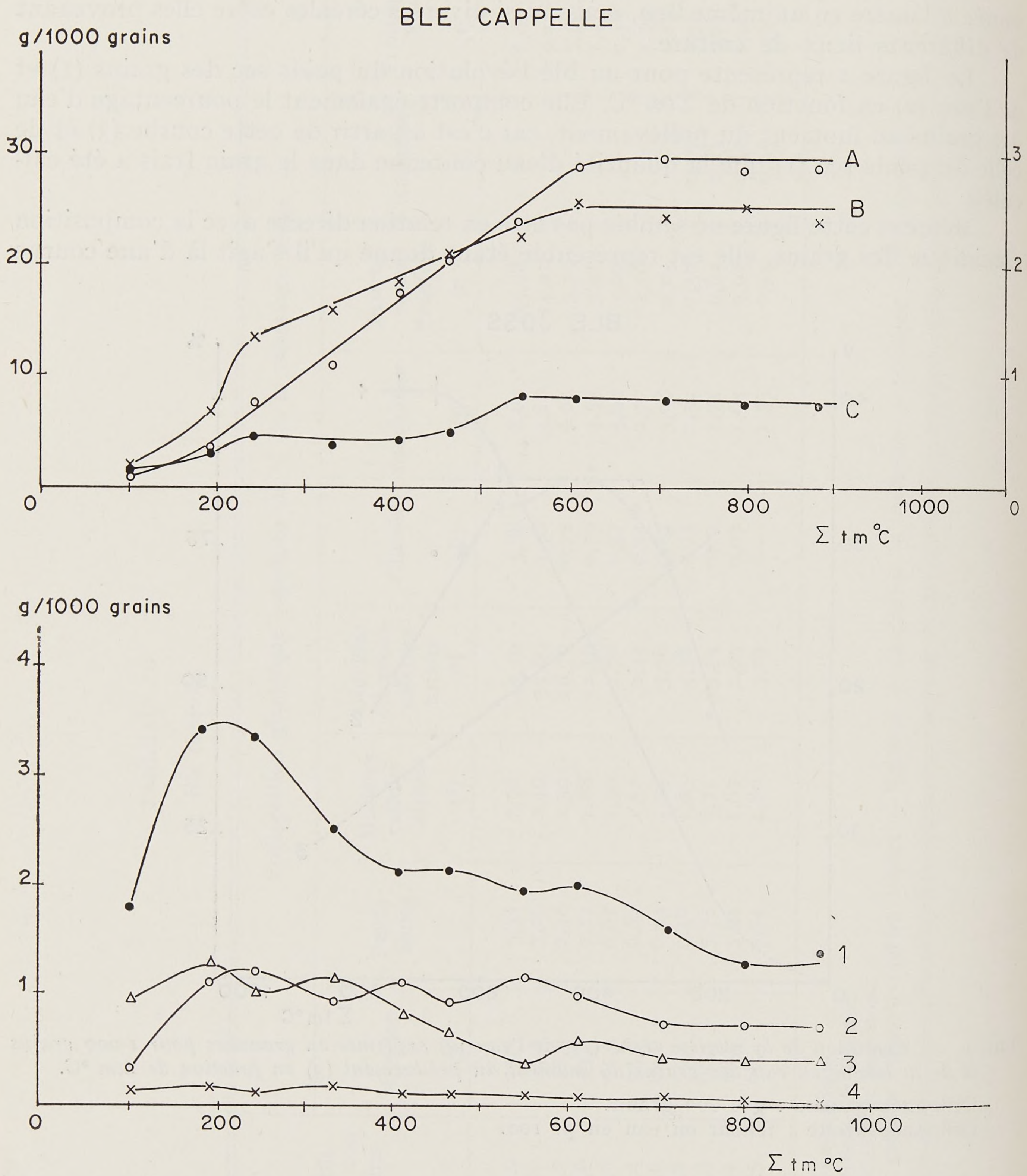


FIG. 2. — *En haut : Évolution de la quantité de polyosides exprimée en grammes pour 1 000 grains en fonction de Σtm °C.*

Ordonnée gauche : A : Amidon.
Ordonnée droite : P : Pentosanes.
C : Cellulose.

En bas : Évolution de la quantité d'Oses et Osides exprimée en grammes pour 1 000 grains en fonction de Σtm °C :

1 glucides éthanolosolubles,
2 saccharose,
3 fructose et fructosanes,
4 glucose.

Cette durée de 12 jours du palier théorique correspond à ce qui est observé par GESLIN et JONARD, 1948, lorsque les conditions climatiques ne présentent pas de particularités pendant cette période. Les différences expérimentales sont à attribuer à des « coups de chaleur » qui sont survenus à ce stade; ils ont provoqué une diminution passagère de la quantité d'eau du grain par excès d'évaporation.

Ainsi, le premier point de divergence entre la courbe théorique et expérimentale correspond avec le maximum absolu de température enregistré en 1968 (33 °C, vers $\Sigma tm = 275$ °C, 17 j après la floraison), le deuxième avec une température de 26,1 °C, enregistrée au vingt-sixième jour après la floraison ($\Sigma tm = 405$ °C), ce qui signifie un accroissement sensible de température par rapport à la moyenne de cette période.

La figure 2 montre l'évolution des polyholosides et des oses et oligosides au cours de la maturation des grains de blé Cappelle. L'amidon est synthétisé régulièrement, l'évolution des pentosanes est semblable à celle de la cellulose. Les glucides éthanolo-solubles, après un maximum au début, décroissent par paliers successifs. Le saccharose, le fructose et les fructosanes évoluent de façon comparable avec toutefois un léger décalage des maxima et minima.

La quantité de glucose présente, déjà faible au début devient pratiquement négligeable en fin de maturation. En dehors de ces déterminations quantitatives, la chromatographie sur papier révèle la présence de très faibles traces de maltose. Les proportions parfois importantes de maltose et de ses homologues supérieurs (MENGER, 1961) peuvent s'expliquer par l'intervention des amylases sur l'amidon provoquée soit par des mauvaises conditions de récolte et de stabilisation du matériel, soit par des conditions de stockage défectueuses.

L'allure générale de l'accumulation des constituants glucidiques dans différentes variétés de blé reste sensiblement la même (CERNING et GUILBOT, 1972, 1975).

Toutefois la formation de la cellulose diffère pour deux variétés cultivées dans des conditions différentes.

L'expression des résultats rapportés à l'organe en cours de maturation permet de distinguer les glucides qui s'accumulent progressivement et plus ou moins rapidement dans le grain — essentiellement amidon, pentosanes, et cellulose — de ceux dont la quantité passe par un ou une série de maxima plus ou moins étalés au début pour diminuer en fin de maturation. Les plus importantes modifications se produisent pendant la période du palier de l'eau.

Les oses et oligosides ont tendance à diminuer en cours de maturation. On peut penser qu'ils sont dégradés par le jeu d'un certain nombre d'enzymes pour être utilisés soit dans la synthèse des polyholosides de réserve, soit dans d'autre voie métabolique (HARRIS, 1962).

Le fait de présenter les résultats en fonction d'un facteur climatique facilite la comparaison des résultats. Ainsi il est intéressant de noter que la fin de l'accumulation de l'amidon se situe sensiblement aux mêmes valeurs Σtm °C (600 et 625 °C) pour deux variétés de blé, alors que le nombre de jours écoulés depuis la floraison varie de 31 à 42 jours, (CERNING et GUILBOT, 1972, 1975).

Cette étude a porté sur l'évolution des glucides dans le grain seulement. Pour élucider complètement le processus de la maturation, il serait nécessaire d'étudier non seulement le grain, mais d'inclure toutes les autres parties de la plante.

IV. — Évolution des oses et oligosides au cours du stockage

Le grain de blé est un organe vivant et respire donc continuellement; il peut être détérioré dans de mauvaises conditions de stockage. Les deux facteurs les plus importants au cours du stockage sont la teneur en eau des grains et leur température. Une altération peut être évitée par séchage du blé humide jusqu'à une teneur en eau de 14,5 p. 100 et en la maintenant ensuite dans cet état à une température relativement basse. C'est-à-dire en assurant de bonnes conditions de stockage soit par aération, soit par ventilation. Lorsque le grain de blé est altéré par de mauvaises conditions de stockage, plusieurs réactions biochimiques se produisent et on constate une augmentation des sucres totaux et réducteurs (GLASS et GEDDES, 1960; MILNER et GEDDES, 1954).

Étant donné que cette évolution semble être due essentiellement au développement des moisissures, il a été suggéré (GLASS *et al.*, 1959), de stocker le blé sous atmosphère d'azote et de CO_2 pour éviter ce développement de fongi. Cependant, en absence de formation de moisissures sous atmosphère d'azote, les sucres réducteurs ou non montraient une évolution considérable, à savoir que la diminution des derniers était essentiellement compensée par l'augmentation des sucres réducteurs. Cette évolution était d'autant plus nette que la teneur en eau des échantillons de blé était élevée (15 à 18 % d'eau). Le stockage du blé humide à l'air entraîne un développement considérable des moisissures, mais ici l'augmentation des sucres réducteurs était moins importante (25 %) que la diminution des sucres non réducteurs; ceci semble indiquer qu'ils étaient essentiellement utilisés par les moisissures.

L'expression des sucres réducteurs ou non en saccharose et maltose est arbitraire. L'étude de GLASS et GEDDES (1960), par chromatographie sur papier a mise en évidence une évolution des sucres individuels. Ces auteurs ont isolé et identifié du d-galactose, du myo-inositol, et du glycérol dans la fraction éthanolo-soluble d'un blé, altéré au cours d'un stockage sous atmosphère d'azote pendant 24 semaines à 30 °C et à une teneur en eau de 18 p. 100.

De plus du d-glucose et du d-fructose étaient décelés. Les mêmes sucres ont été observés dans l'échantillon témoin, accompagnés de deux substances, identifiées comme étant du d-galactose et du myo-inositol. LYNCH et GLASS (1962), ont également utilisé la technique de chromatographie sur papier dans une étude sur l'évolution des oses et oligosides dans un blé humide, stocké pendant 8 semaines sous différentes atmosphères (tableau 11).

Ces échantillons stockés dans des conditions anaérobies et qui étaient donc dépourvus de moisissures, se sont détériorés presque aussi rapidement que ceux stockés dans des conditions aérobies. Tous les échantillons ont montré une évolution de leur teneur en sucres. La teneur en saccharose du blé stocké à l'air avait diminué fortement alors que peu de changements se sont produits quant à la teneur en glucose, fructose, galactose ou maltose. Sous atmosphère d'azote ou CO_2 la teneur en saccharose avait diminué et les quantités de glucose, de fructose et de galactose présentes avaient considérablement augmenté.

L'augmentation du galactose montre que le saccharose et les glucofructosanes ne sont pas les seuls sucres réducteurs qui se sont dégradés au cours du stockage. Le galactose peut être libéré soit du raffinose par l'action d'une d-galactosidase produisant en même temps du saccharose, soit par l'hydrolyse des galac-

TABLEAU 11

Évolution des teneurs en oses et oligosides exprimées en p. 100 de la substance sèche du blé conservé dans différentes conditions : 8 semaines à 30 °C, 20 p. 100 d'eau (1)

Glucides solubles	Témoin	Conservé sous		
		Air	Azote	CO_2
Fructose	0,06	0,05	0,18	0,16
Glucose	0,08	0,07	0,24	0,23
Galactose	0,02	0,03	0,09	0,09
Saccharose	0,54	0,21	0,39	0,36
Maltose	0,05	0,01	0,04	0,03
Sucres réducteurs exprimés en maltose (2)	0,41	0,41	1,17	1,17
Sucres non réducteurs exprimés en saccharose	1,90	0,43	1,00	1,15

(1) Résultats de LYNCH *et al.*, 1962.
(2) Méthode au Ferricyanure.

TABLEAU 12

Évolution des teneurs en oses et oligosides du blé (exprimée en p. 100 de la substance sèche) conservé dans diverses conditions (1)

Conservation en jours	teneur en eau	température	humidité relative	Saccharose	Maltose	Difructose	Raffinose
0		16-21	50-70	0,88	0,04	0,26	0,19
116				0,80	0,04	0,22	0,18
160				0,77	0,04	0,21	0,19
172				0,75	0,05	0,21	0,19
0	12,6	30-32	90-95	0,80	0,04	0,22	0,18
10	12,6			0,77	0,04	0,21	0,18
5	19,8			0,63	0,08	0,11	0,16
3	35,4			0,55	0,70	0,09	0,10

(1) Résultats de TAUFEL *et al.*, 1959.

tolipides. Les sucres non réducteurs étaient largement utilisés dans l'échantillon stocké à l'air (tableau 11).

Les travaux de TAUFEL *et al.* (1959), sur l'évolution de la teneur en sucres du blé (tableau 12) ont montré qu'il n'y a pratiquement pas de changement des teneurs en di- et triholosides dans des bonnes conditions de stockage (16 à 21 °C, 50 à 70 % d'humidité relative). Toutefois on observe une légère diminution de la teneur en saccharose.

Le stockage à une température plus élevée et une forte teneur en eau provoque

un décroissement du saccharose, glucodifructose et raffinose. La quantité de maltose s'accroît fortement dans l'échantillon stocké à une teneur en eau de 35,4 p. 100.

GUILBOT et TOLLIER (1969), ont étudié l'évolution biochimique du blé stocké à une teneur en eau de 14 à 14,5 p. 100 d'eau sous atmosphère d'azote ou CO_2 ou sous ventilation, pendant 2 ans avec des températures allant de 5 °C à 20 °C en fonction de la saison. Dans ces conditions aucune évolution de la fraction glucidique éthanolo-soluble des oses et oligosides constituant cette fraction n'a été mise en évidence.

V. — Évolution des oses et oligosides au cours de la germination

Nos connaissances sur l'évolution et sur les modifications des teneurs en sucres au cours de la germination du grain de blé sont relativement fragmentaires. TAUFEL *et al.*, 1959, ont entrepris une étude sur les modifications qui se produisent dans un blé au cours de la germination après un procédé de trempage de 2 jours (tableau 13).

Après 5 jours de germination la teneur en saccharose du blé avait doublé; le pourcentage de maltose, très faible dans le blé initial s'élève à 3,79 p. 100 et la quantité de glucodifructose avait quadruplé. La teneur en raffinose avait augmenté de 0,28 à 0,94 p. 100 en 5 jours. Toutefois les auteurs précisent qu'il n'est pas exclu que cette dernière valeur comprenne une certaine quantité de maltotriose qui superposée, a pu être élué et dosé en même temps avec le raffinose. Selon TAUFEL *et al.*, (1959), l'évolution au cours de la germination est due aux réactions de dégradation, d'isomérisation et de transglycosidation. La β-amylase est présente à l'état libre, mais l'activité α-amylasique est faible.

La β-amylase liée, inactive est transformée en sa forme libre et devient active

TABLEAU 13

Influence de la germination sur la teneur en oligosides du blé (1)

Traitement	Temps en jours	Teneur en oligosides (exprimée en p. 100 de la substance sèche)			
		Saccharose	Maltose	Glucodifructose	Raffinose
Témoin		0,80	0,06	0,11	0,28
Trempage	1	0,79	0,14	0,08	0,21
	2	0,70	0,24	0,10	0,17
Germination	3	0,71	0,51	0,08	0,10
(21° à 24 °C	4	0,64	0,93	0,16	0,33
50-70 %	5	0,81	1,03	0,32	0,57
H.R.)	6	1,00	2,69	0,58	0,64
	7	1,74	3,79	0,49	0,94

(1) Résultats de TAUFEL *et al.*, 1959.

au cours de la germination (AUDIDIER *et al.*, 1966) et l'activité α-amylasique devient très importante. L'action combinée de ces deux enzymes provoque la dégradation de l'amidon avec apparition du maltose.

VI. — Les glucides de la farine et des produits de mouture

6.1. — *Composition glucidique de la farine*

Le tableau 14 résume la composition glucidique moyenne de farines commerciales américaines et européennes. On retrouve ici les différences déjà constatées dans le cas du grain entier.

La teneur en amidon varie entre 74,8 et 85,3 p. 100 et on peut supposer que la

TABLEAU 14

Composition glucidique moyenne de farines de blé commerciales
(exprimée en p. 100 de la substance sèche)

Amidon	Matières cellulosiques	Pentosanes	Oses et oligosides	Références bibliographiques
79,3	0,12	2,60		Neumann et Pelshenke, 1954
81,3	0,41	2,30	0,92	Fraser et Holmes, 1956
80,1	0,25	3,25	1,00	Guilbot, 1963
81,5		2,16	2,58	Audidier *et al.*, 1966
74,8-85,3				Pomeranz et MacMasters, 1968
84,5-85,5			1,40-2,58	Tollier *et al.*, 1968
83,4			2,26	

teneur en protéines de ces farines (POMERANZ et MACMASTER, 1968) est inversement proportionnelle à celle de l'amidon.

La teneur en matières cellulosiques fait apparaître d'importantes différences qui sont difficiles à expliquer d'une manière satisfaisante. Il s'agit en effet de résultats concernant une farine anglaise (FRASER, 1956) allemande (NEWMANN et PELSHENKE, 1954) et française (GUILBOT, 1963), obtenus par différentes méthodes. De plus, le taux d'extraction des farines, qui influe considérablement sur la teneur en cellulose, est inconnu. A l'heure actuelle, il est possible en meunerie de produire des farines qui ne présentent que des traces de cellulose.

Les variations des teneurs en pentosanes et sucres sont également très importantes. Ici encore on doit prendre en considération les différentes origines de farines et les méthodes analytiques utilisées. L'information existante est insuffisante pour être en mesure de donner une explication valable des différences de la teneur en pentosanes qui va de 1,65 à 3,25 p. 100. Par contre, la variation du pourcentage des sucres peut être partiellement expliquée. On peut en effet supposer que la valeur de 0,92 p. 100 a été obtenue après une extraction à basse température et il est connu

TABLEAU 15

Teneur en oses et oligosides de la farine de blé exprimée en p. 100 de la substance sèche

Oses et oligosides	Colin et Belval 1935	Williams et Bevenue 1951	Koch *et al.* 1951	Mackenzie 1958	Taüfel (1) 1959	Vaisey et Unrau 1964 (1)	
						Farine de blé de printemps	Farine de blé Durum
Oligosides						1,28	0,86
Lévosine	0,60		— (2)	0,45	—	—	—
Raffinose	—	0,82	0,07	0,17	0,06	—	—
Glucodifructose	—		—	0,33	0,21	—	—
Melibiose	—		0,18 (3)	0,00	—	—	—
Saccharose	0,22	0,21	0,10	0,27	0,32	0,22	0,32
Glucose			0,01	0,04	—	0,05	0,03
Fructose	0,17	0,09	0,02	—	—	0,05	0,05
Maltose	—	0,05	0,07	trace	0,07	0,09	0,13

(1) Valeurs moyennes.
(2) Présent mais non déterminé.
(3) Démontré par MONTGOMERY et SMITH (1954) comme un glucofructane et non du mélibiose.

que cette technique n'aboutit pas à un épuisement complet (CERNING, 1970). La teneur en sucre de 1,0 p. 100, indiquée par GUILBOT, 1963, a été obtenue par chromatographie sur papier; ce dosage ne comprend pas toute la fraction osidique de la farine. Les résultats de TOLLIER *et al.*, 1968, précisant une teneur en sucres allant de 1,40 à 2,58 p. 100 avec une valeur moyenne de 2,26 p. 100 ainsi que ceux indiqués par AUDIDIER *et al.*, 1966, ont été obtenus après extraction répétée à chaud par l'éthanol (CERNING, 1970; CERNING-BEROARD, 1975). Il est important de souligner que la teneur de ces glucides éthanolo-solubles totaux d'une farine extraite d'une même variété de blé cultivée la même année en différents lieux peut varier de 1,8 à 2,90 (TOLLIER *et al.*, 1968).

6.2. — *Glucides solubles de la farine*

Le tableau 15 indique des résultats obtenus entre 1951 et 1964 concernant les glucides solubles dans l'éthanol à 70 ou 80 p. 100 de la farine de blé et dosés par chromatographie sur papier.

Les valeurs confirment essentiellement les résultats de COLIN et BELVAL (1935), à savoir que la farine de blé contient une fraction osidique d'abord appelée lévosine (TANRET, 1891, BELVAL, 1924). Il s'est avéré plus tard par des études chromatographiques que cette fraction, n'était pas constituée d'une substance unique mais de 6 constituants. Cette fraction est pondéralement la plus importante des glucides solubles, et il semble que le blé durum en contienne moins que le blé tendre (VAISEY et UNRAU, 1964).

Étant donné que le raffinose semble être essentiellement localisé dans les couches tégumentaires et le germe, la farine n'en contient que de faibles quantités. La teneur en maltose, déterminée par chromatographie sur papier, est généralement faible et ne dépasse pas 0,09 p. 100 dans la farine de blé tendre; elle est de l'ordre de 0,13 p. 100 dans la semoule de blé durum; cependant, compte tenu de l'information très limitée existant sur la composition glucidique du blé durum, aucune conclusion ne doit être tirée de cette différence.

Les pourcentages du saccharose indiqués par les divers auteurs européens sont assez similaires. La disparité entre les valeurs et celles postulées antérieurement par des auteurs américains a été attribuée à la présence d'oligosides sensibles à l'hydrolyse acide (KOCH *et al.*, 1951), (MONTGOMERY et SMITH, 1954).

La farine ne contient que de faibles quantités de glucose et de fructose; quelques auteurs n'ont trouvé que des traces de ces oses (MACKENZIE, 1958; TAUFEL *et al.*, 1959); d'autres ont indiqué des valeurs de glucose et fructose allant de 0,01 à 0,05 p. 100 (KOCH *et al.*, 1951; VAISEY et UNRAU, 1964).

VII. — Produits de mouture commerciaux européens et américains

La comparaison de la composition glucidique des produits de mouture américains et européens s'avère extrêmement difficile, du point de vue technologique. L'objectif de la meunerie est de séparer les trois principales parties du grain de blé en produits farine, son, et germe. Toutefois, les diagrammes de mouture diffèrent déjà d'un moulin à un autre dans un même pays et ils diffèrent encore plus d'un

pays à l'autre. De plus, les produits de mouture obtenus dépendent de l'origine du blé et de grandes difficultés existent dans la terminologie et la traduction des différentes fractions énumérées. L'histogramme (fig. 3) constitue une tentative de comparaison des fractions de meunerie obtenues aux États-Unis, en Allemagne et

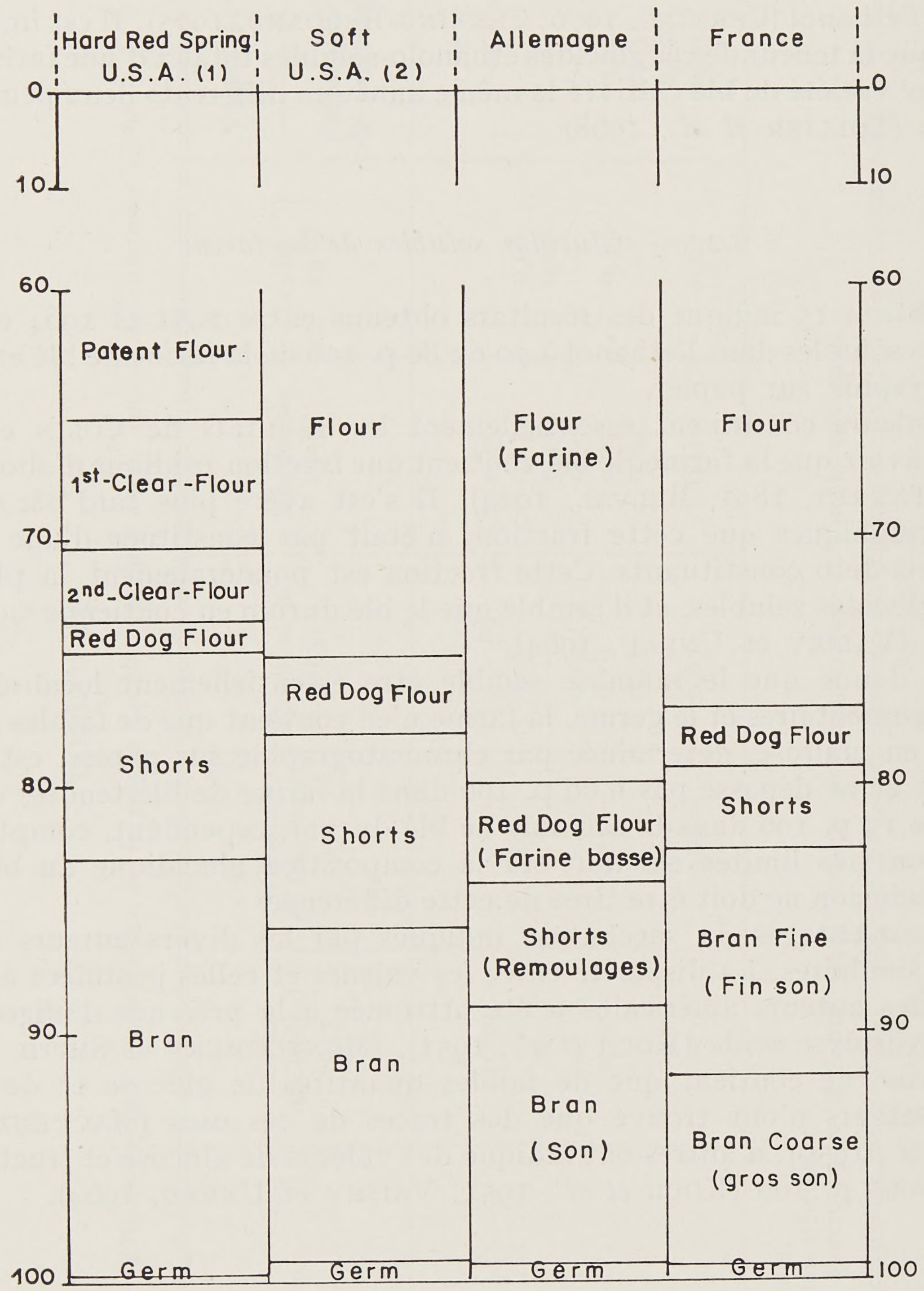


FIG. 3. — *Histogramme des taux d'extraction moyens du blé commercial pratiqués dans différents pays.*

(1) U.S.D.A., 1942.
(2) POMERANZ et MACMASTERS, 1968.

en France; il illustre les différences existantes et facilite la compréhension des résultats relatifs à la composition glucidique de ces fractions. Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que cette illustration a été largement simplifiée et que n'importe quelle sous-fraction peut être obtenue par une modification du diagramme de la meunerie. Le taux d'extraction des farines est le plus élevé en Allemagne (jusqu'à

80 %), pays où ces farines sont largement utilisées en panification. Les résultats de la mouture française correspondent à des moyennes françaises; ceux des États-Unis d'une part à une mouture d'un « Hard Red Spring » et d'autre part à celle d'un « soft wheat » (D'APPOLONIA *et al.*, 1971; NORTHERN REGIONAL RESEARCH LABORATORY, 1942). Il apparaît (fig. 3) qu'une comparaison des issues de meunerie, telles que les farines basses, remoulages et sons est presque impossible, il n'y a pas de vraie analogie. Toutefois, on peut espérer une meilleure compréhension des résultats résumés dans les tableaux 16, 17 et 18. La teneur en cendres est indiquée dans ces tableaux, étant donné que la vente des farines en Allemagne (type de farine = teneur en cendres × 1 000) et en France est basée sur cette teneur.

Les pourcentages des cendres et de l'amidon des moutures américaines de deux types de blés différents sont assez semblables; il en est de même en ce qui concerne la farine basse et les remoulages, malgré les différences considérables dans le taux d'extraction et de la teneur en cendres. De grandes variations apparaissent parmi tous les résultats concernant les sons et les germes.

La composition glucidique du blé français et allemand ainsi que leurs fractions de mouture respectives (BOLLING et DREWS, 1971; RICHTER, 1961; SOUCI *et al.*, 1969) est comparée dans les tableaux 17 et 18. Les résultats analytiques des blés sauf pour les sucres sont relativement proches alors que ceux des farines et des sous-produits varient largement. Ceci est aussi vrai pour les taux d'extraction et la teneur en glucides. La farine basse de la mouture allemande est plus riche en cendres et matières cellulosiques et plus pauvre en amidon que la fraction correspondante de mouture française. Les remoulages, le son et le germe montrent des différences moins prononcées. Toutefois les 2 types de germes issus de la meunerie allemande contiennent plus d'amidon que ceux d'origine française. En revanche, les germes français ont une teneur en matières cellulosiques deux fois plus élevée que le germe n^0 1 de la meunerie allemande.

Les résultats de matières cellulosiques respectivement de 4,5 et 2,2 p. 100

TABLEAU 16

Composition glucidique du blé américain et de ces produits de mouture
(exprimée en p. 100 de la substance sèche)

Produit	Proportion du blé		Cendres		Amidon		Pentosanes	Matières cellulosiques	Oses et oligosides
	1	2	1	2	1	2	1	2	1
Blé	100	100	2,14	1,68	61,2	67,4	6,0	2,5	3,0
Farine	65,3	74,8	0,49	0,45	77,6	80,3	1,65	—	1,4
Farine basse	1,3	3,1	3,13	2,44	47,8	49,4	5,2	2,61	5,3
Remoulages	9,7	7,9	5,78	4,30	22,8	24,0	15,9	7,62	7,4
Sons	18,9	14,7	7,50	6,90	13,5	6,8	20,9	12,10	6,4
Germe	0,2	0,8	4,97	4,55	11,6	22,1	4,3	3,96	19,1

(1) U.S.D.A. mimeographed publication A.C.E. 189 (1942).
(2) POMERANZ et MACMASTERS (1968), valeurs moyennes.

TABLEAU 17

Composition glucidique moyenne d'un blé français et de ses principaux produits de mouture
(exprimée en p. 100 de la substance sèche)

Produit	Proportion du blé	Cendres	Amidon	Matières cellulosiques	Pentosanes	Sucres
Blé	100	1,8	68,3	2,4	8,5	4,4
Farine . . .	77,0	0,55	81,8	0,3	1,8	2,5
Farine basse	2,4	2,4	54,8	1,1	7,9	7,75
Remoulages	3,2	4,1	24,6	6,0	24,7	10,80
Fins sons. .	9,1	6,1	19,3	10,4	32,4	8,35
Gros sons. .	7,7	7,5	14,7	12,3	34,7	7,15
Germes n° 1	0,4	4,7	20,8	4,5	13,5	16,90
Germes n° 2	0,2	4,6	20,8	3,3	8,2	20,55

TABLEAU 18

Composition glucidique moyenne d'un blé allemand et de ses principaux produits de mouture
(exprimée en p. 100 de la substance sèche)

Produit	Proportion du blé	Cendres	Amidon	Matières cellulosiques	Pentosanes	Oses et oligosides
Blé	100	1,9	69,0	1,95	7,9	2,35
Farine (1) type 405		0,41	74,0	0,1	2,47	1,80
Farine type 550 . . .		0,54	74,0	0,15	2,65	2,00
Farine type 1050 . . .		1,10	71,2	0,32	3,95	1,80
Farine type 1600 . . .	80	1,65	69,1	1,4	7,30	2,00
Farine basse	4,0	4,0	39,0	3,4		
Remoulages	5,0	5,0	19,0	6,5		
Sons	10,0	8,0	15,0	11,5		
Germes 1. .	0,6	4,5	29,0	2,2		
Germes 2. .		3,7	36,0	3,8		

(1) Le type d'une farine est obtenu en multipliant la teneur en cendres par 1 000.

sont significatifs en ce sens qu'ils ont été obtenus tous deux par la même méthode de WEENDE.

Les remoulages et les sons sont les fractions les plus riches en pentosanes, alors que le germe est relativement riche en sucres.

A notre connaissance il n'existe pas d'information précise analogue sur les sous-produits de la meunerie allemande, mais on peut supposer que leur composition biochimique est comparable à celle des produits français.

7.1. — *Farines turboséparées*

La turboséparation ou la classification par air, nouveau procédé technologique, a retenu une attention particulière dans l'industrie meunière. Au cours du procédé les particules de la farine après un broyage poussé, sont séparées dans un courant d'air par différence de densités.

La turboséparation est utilisée pour déplacer les protéines et pour produire des farines d'une qualité plus uniforme à partir des blés de qualité variable.

La répartition des différents glucides dans les farines turboséparées a été étudiée par AUDIDIER *et al.*, (1966) (tableau 19).

TABLEAU 19

Teneur en amidon, pentosanes, oses et oligosides de farines turboséparées
(exprimée en p. 100 de la substance sèche)

Échantillons	Amidon	Pentosanes	Oses et oligosides
Farine témoin	81,5	2,16	2,58
Fraction grosse	80,0	2,29	2,75
Fraction moyenne	83,7	1,86	2,39
Fraction fine	72,5	2,47	3,22

Les fractions fines, riches en protéines ont des teneurs élevées en pentosanes et en sucres solubles.

Les fractions moyennes à faibles teneur en protéines sont plus pauvres en pentosanes et en sucres que les autres fractions. Enfin la fraction grosse a une composition glucidique voisine de celle de la farine d'origine.

7.2. — *Son commercial*

Les teneurs en amidon, matières cellulosiques, pentosanes et glucides solubles du son sont indiquées dans le tableau 20. Ici encore on retrouve le problème évoqué auparavant; les résultats analytiques dépendent non seulement du blé initial et du diagramme de mouture, mais aussi des méthodes analytiques utilisées.

Un tel tableau ne peut que donner une information relative sur la composition très différente des échantillons commerciaux et confirmer que les polyholosides de structure, tels que les pentosanes et les matières cellulosiques sont concentrés dans les sons. Des quantités considérables (10 à 19 p. 100) d'amidon restent associées aux sons commerciaux. SAUNDERS et WALKER, 1969, STEVENS, 1970 et SAUNDERS, 1971, ont mis en évidence la présence de stachyose, fructosylraffinose et néokestose dans le son de blé. Par ailleurs, des traces de pentoses ont été identifiées.

TABLEAU 20

Composition glucidique du son commercial
(exprimée en p. 100 de la substance sèche)

Amidon	Matières cellulosiques	Pentosanes	Oses et oligosides	Références bibliographiques
15,65 (1)	9,75 (1)	22,50 (1)		Neumann et Pelshenke, 1954
8,74 (2)	11,33 (2)	30,50 (2)		
9,9	24,30	30,20	5,30	Fraser et Holmes, 1959
15,0	11,50			Richter, 1961
18,4				Thivend *et al.*, 1965
5,33-8,38	10,7-13,5			Pomeranz et MacMasters, 1968
18,0	7,5	26,7		Salo et Kutilainen, 1970
13,55		20,9	6,36	D'Appolonia *et al.*, 1971
19,3 (1)	10,4 (1)	32,4 (1)	8,35 (1)	Communications personnelles, 1972
14,7 (2)	12,3 (2)	34,7 (2)	7,15 (2)	

(1) Fins sons.
(2) Gros sons.

7.3. — *Germe Commercial*

La composition glucidique de divers échantillons commerciaux de germe est résumée dans le tableau 21.

La teneur en amidon, qui varie de 12 à 36 p. 100 est l'indice du degré de séparation du germe de la fraction albumen. Les pourcentages de matières cellulosiques et de pentosanes qui vont respectivement de 1,7 à 5,5 et de 7,0 à 13,5 p. 100 s'expliquent essentiellement par la présence dans le germe de quantités variables de

TABLEAU 21

Composition glucidique du germe de blé commercial
(exprimée en p. 100 de la substance sèche)

Amidon	Matières cellulosiques	Pentosanes	Oses et oligosides	Références bibliographiques
12,0-34,0	1,7-3,5	7,0-12,0	12,5-21,4	Neumann et Pelshenke, 1954
15,85	5,5	7,7	18,3	Fraser et Holmes, 1959
			14,50	Dubois *et al.*, 1960
			28,6	Linko *et al.*, 1960
29,0-36,0	2,2-3,8			Richter, 1961
16,2-27,8	3,26-4,65			Pomeranz et MacMasters, 1968
11,6		4,3	19,1	D'Appolonia *et al.*, 1971
20,8	3,3-4,5	8,2-13,5	16,9-20,6	Communication personnelle

parties périphériques du grain. Comparé à d'autres produits de mouture, le germe présente la plus forte teneur en sucres, qui peut atteindre jusqu'à 28,6 p. 100 (LINKO *et al.*, 1960).

Les travaux plus récents de GARCIA *et al.*, (1972), concernant le germe de blé délipidé abouti à des résultats qui sont en bon accord avec ceux précédemment publiés par d'autres auteurs.

VIII. — Conclusions

Un progrès considérable a été réalisé au cours des vingt dernières années dans le domaine des connaissances de la composition glucidique du blé; et ceci en particulier grâce à de nouvelles techniques analytiques de séparation. Cependant les oses et oligosides ont retenu peu d'attention dans le passé et c'est seulement depuis peu de temps que la présence de néokestose et stachyose ont été mises en évidence.

Les constituants des parois cellulaires, tels que la cellulose, les hémicelluloses et les pentosanes, ont une importance certaine en alimentation animale et en panification. Mais en raison de leur nature complexe, les études dans ce domaine sont restées fragmentaires. L'utilisation récente des enzymes ouvre sans doute de nouvelles voies de recherches qui permettront d'approfondir nos connaissances au sujet de ces constituants glucidiques complexes.

Une certaine prudence s'impose dans la considération des résultats existants dans la littérature.

Il n'est pas possible pour l'instant de savoir si les différences dans la composition glucidique observées par divers auteurs sont dues aux méthodes analytiques utilisées ou si elles sont plutôt à attribuer aux facteurs variétaux ou aux conditions de culture et d'environnement.

Une recherche bibliographique fait apparaître que nos connaissances sur les modifications qui se produisent au cours du stockage et de la germination du blé sont encore fragmentaires. De plus, aucune comparaison est possible entre différentes espèces de blé, tels que le triticum vulgare, le triticum durum et les hybrides.

En conséquence, un travail considérable reste à faire sur la nature de la composition des glucides afin de concilier certains points de vues divergents et d'approfondir nos connaissances dans ce domaine.

Reçu pour publication en avril 1977.

Summary

Wheat carbohydrate composition

Carbohydrates are the most abundant constituents of the wheat kernel, forming about 80 per cent of the total dry matter. They include starch which preponderates, cellulose, hemicelluloses pentosans and soluble sugars. The latter include oses, di- and oligosaccharides such as glucose, sucrose, neokestose, raffinose and glucodifructose.

In the review, qualitative and quantitative aspects of the precited carbohydrates have been studied. Their histological location in the pericarp, the starchy endosperm and the germ of the wheat kernel has been reported.

During development and maturation of wheat, the changes of kernel carbohydrate, given as a

function of a climatic factor, the cumulative daily mean temperature from the point of flowering, has shown that soluble carbohydrates reach their maximum in the very early stage of development. Then, they decrease to a more or less constant value whereas starch, pentosans and crude fibre increase rapidly. Some important phases in the formation of the carbohydrates become apparent and the relationship between the development of these components and the hydration of the kernel is discussed.

Change in sugar content during storage of wheat kernel and the increase of the reducing sugars are attributed to the growth of molds, due to a too high moisture content and temperature of cereals. The samples stored under nitrogen, carbon dioxide and anaerobic conditions, hence without molds, deteriorated almost as fast as stored under aerobic conditions.

Although relatively little information is available on the changes in sugar content during germination of the wheat kernel, the predominant role of the combined action of the α- and β-amylases causes rapid production of maltose from starch.

The carbohydrate composition of flours and milling products, such as conventional and air-classified flours, commercial bran and germ, has been reviewed.

A comparison between the carbohydrate composition of American and European milling fractions has been difficult because the difference in processing techniques. An attempt has been made by means of an histogram of extraction rates to compare, at least approximatively, American German, and French milling fractions, to illustrate the existing differences and to facilitate, the comprehension on the carbohydrate composition of these products.

Références bibliographiques

ACKER L., 1967. Im Handbuch der Lebensmittelchimie, vol. II 12, W. Diemair (Editor). Springer Verlag. Berlin, Germany.

ADAMS G. A., 1956. Can J. Research. **33**, 56-67.

AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTRY (AACC), 1962. St-Paul, Minn.

D'APPOLONIA B. L., 1971. Bakers Digest, **45**, 20-24.

D'APPOLONIA B. L., GILLES K. A., OSMAN E. M. et POMERANZ Y., 1971. Wheat: Chemistry and Technology, Y. Pomeranz (Editor) Amer. Ass. Cereal Chemists, St-Paul, Minn.

ASPINALL G. O., 1959. Advances in Carbohydrate Chemistry, vol. 9. Melville, L. Wolfram and R. Stuart Tipson (Editors). Academic Press Inc., New-York, N. Y.

AUDIDIER Y., CERNING J., COLAS A., de LA GUERIVIÈRE J. F., GUILBOT A., MERCIER Ch., et SCHLEICHER R., 1966. Ind. Aliment. Agr., **83**, 519-527.

AVIGAD G., AMARAL D., ASENSIO C. et HORECKER B. L., 1962. J. Biol. Chem., **237**, 2736-2743.

BAILEY C. H., 1944. The constituents of wheat and wheat products. Reinhold: New-York.

BANKS W. et GREENWOOD C. T., 1967. Die Stärke, **19**, n° 12, 394-398.

BANKS W., GREENWOOD C. T. et MUIR D. D., 1970. Die Stärke, **22**, 105-108.

BANKS W. et GREENWOOD C. T., 1972. Ann. New-York Acad. Sci., **210**, 17-33.

BELL D. J. et PALMER A., 1952. J. Chem. Soc. 3763-3770.

BELVAL H., 1924. Thèse de doctorat ès-sciences, Paris.

BICE C. W., MAC MASTERS M. M. et HILBERT G. E., 1945. Cereal Chem., **22**, 463-476.

BISHOP C. T., 1964. Advances in Carbohydrate Chemistry, vol. 19, Melville, L. Wolfram, and R. Stuart Tipson (Editors). Academic Press Inc., New-York, N. Y.

BOGGS L. A., CUENDET L. S., DUBOIS M. et SMITH F., 1952. Anal. Chem., **24**, 1148-1151.

BOLLING H. et DREWS E., 1971. Brot Gebäck, **25**, 108-109.

BONDARENKO A. N. et SMIRNOV V. A., 1966. Prlkladnaya Biokhimiya i Mikro-biologiya, **2**, 139-143.

BRENCHLEY W. E., 1909 A. Ann. Botany, **23**, 117-138.

BRENCHLEY W. E. et HALL A. D., 1909 B. *J. Agric. Sci.*, **3**, 195-217.

BRUCKNER G., 1966. Bread in our Time. Moritz Schäfer, Detmold, Germany.

BRUYN J. W., VAN KEULEN H. A. et FERGUSON J. H. A., 1968. *J. Sci. Fd. Agric.*, **19**, 597-601.

CERNING J., 1969. Résultats non publiés.

CERNING J., 1970. Thèse de doctorat d'université, mention sciences, Faculté des Sciences de l'Université de Lille, France.

CERNING J., GUILBOT A., 1973. Cereal Chem., **50**, 220-232.

Cerning-Beroard J. et Guilbot A., 1975. Ann. Technol. Agric., **24**, 143-170.
Charbonnière R., Duprat F. et Guilbot A., 1973. Cereal Sci. Today, **18**, Abst., 286.
Champagnol F. et Bourzeix M., 1971. J. of Chrom., **59**, 472-475.
Clendenning U. A. et Wright D. E., 1950. Can. J. Research, **28** F, 390-400.
Cole E. W., 1967. Cereal Chem., **44**, 411-416.
Colin H. et Berval H., 1923. Compt. Rend. Ac. Sc., **177**, 973.
Colin H. et Belval H., 1935. Compt. Rend. Ac. Sc., **200**, 2032.
Cooper J. A., Smith W., Bacila M. et Medina H., 1959. J. Biol. Chem., **234**, 445-448.
Davis J. S. et Gander J. E., 1967. Anal. Biochem., **19**, 72-79.
De Stefanis V. A. et Ponte J. G., Jr., 1968. J. of Chrom., **57**, 116-120.
Drapron R. et Guilbot A., 1962. Ann. Technol. Agric., **11**, 175-218.
Dubois M., Geddes W. F. et Smith F., 1960. Cereal Chem., **37**, 557-568.
Elder A. H., Lubisich T. H. et Mecham D. K., 1953. Cereal Chem., **30**, 103-114.
Evers A. D., 1971. Die Stärke, **23**, n° 5, 157-162.
Evers A. D. et McDermott E. E., 1970. Die Stärke, **22**, n° 1, 23-26.
Evers A. D., Gough B. M. et Pybus J. N., 1971. Die Stärke, **23**, n° 1, 16-18.
Evers A. D., 1973. Die Stärke, **25**, n° 9, 303-304.
Evers A. D., Greenwood C. T., Muir D. D. et Venables C., 1974. Die Stärke, **26**, n° 2, 42-46.
Fang Ming Lin et Pomeranz Y., 1968. Anal. Biochem., **24**, 128-131.
Fausch H., Kundig W. et Neukom H., 1963. Nature, **199**, 287.
Foster A. B., 1957. Advances in Carbohydrate Chemistry, vol. 9, Melville, L. Wolfram, and R. Stuart Tipson (Editors). Academic Press Inc. New-York. N. Y.
Fraser J. R. et Holmes D. C., 1956. J. Sci. Food. Agr., **7**, 589-594.
Fraser J. R. et Holmes D. C., 1959. J. Sci. Food. Agr., **10**, 506-512.
Gallant D., Mercier C. et Guilbot A., 1972. Cereal Chem., **49**, n° 3, 354-365.
Gallant D. et Guilbot A., 1973. Die Stärke, **26**, n° 10, 335-342.
Gallant D., Derrien A., Aumaitre A. et Guilbot A., 1973. Die Stärke, **25**, n° 2, 56-64.
Garcia W. J., Gardner H. W., Cavins J. F., String Fellow A. C., Blessin C. W. et Inglett G. E., 1972. Cereal Chem., **49**, 499-507.
Geoffroy R., 1934. Bull. Soc. Chim. Biol., **16**, 1297-1305.
Geslin H. et Jonard J., 1948. Ann. Nutr. Alim., **2**, 111-121.
Gilles K. A. et Smith F., 1956. Cereal Chem., **33**, 29-37.
Glass R. L., Ponte J. G. Jr., Christensen C. M. et Geddes W. F., 1959. Cereal Chem., **36**, 341-356.
Glass R. L. et Geddes W. F., 1960. Cereal Chem., **37**, 568-572.
Gough B. M. et Pybus J. N., 1971. Die Stärke, **23**, n° 6, 210-212.
Gough B. M. et Pybus J. N., 1973. Die Stärke, **25**, n° 4, 123-130.
Greenwood C. T., 1972. Report of the International Association for Cereal Chemistry, Congress, Vienna.
Guilbot A., 1963. Cycle de conférences « Farine » du C.T.U. Bulletin du C.T.U. (Centre Technique de l'Union), 46-63.
Guillemet R., 1935. Académie d'Agriculture de France, Procès-verbal de la séance du 10 juillet.
Guillemet R. et Preceptis P., 1942. Académie d'Agriculture de France. Procès-verbal de la séance du 15 avril, 1-3.
Guillemet R. et Guilbot A., 1945. Bull. Soc. Chim. Biol., **27**, 49-55.
Hanssen E., Dodt E. et Niewmann E. G., 1953. Kolloid Z., **130**, 19.
Harris G., 1962. Barley and Malt, H. G. Cock (Editor). Academic Press, New-York and London.
Hopkins C. Y. et Graham R. P., 1935. Can. J. Research, **12**, 820-824.
Huggett A.S.O. et Nixon D. A., 1957. Biochem. J., **66**, 12 p.
I.N.R.A., 1950. Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales. Ind. Agric. Alim., **1-2**, 43-49.
Jelaca S. L. et Hlynka I., 1972. Cereal Chem., **49**, 489-495.
Jenkins L. D., Loney D. P. et Meredith P., 1974. Cereal Chem., **51**, n° 6, 718-733.
Johnson G., Lambert C., Johnson D. K. et Sunderwirth S. G., 1964. J. Agr. Food Chem., **12**, 216-219.
Koch R. B., Geddes W. F. et Smith F., 1951. Cereal Chem., **28**, 424-420.

KOWKABANY, G. N. 1954. Advances in Carbohydrate Chemistry, vol. 9, Melville, L. Wolfram and R. Stuart Tipson (Editors). Academic Press Inc., New-York, N. Y.

KULP K., 1968. Cereal Sci. Today, **13**, 414-418.

KULP K., 1973. Cereal Chem., **50**, n° 6, 666-679.

KULP K., 1973. Bakers Digest, **47**, n° 1, 55-59.

KUNDIG W., NEUKOM H. et DEUÉL H., 1961. A. Helv. Chim. Acta, **44**, 823-829.

KUNDIG W., NEUKOM H. et DEUEL H., 1961 B. Helv. Chim. Acta, **44**, 969-976.

LIBBY, ROBERT A., 1970. Cereal Chem., **47**, 273-281.

LINDNER M., 1969. Chemiker-Ztg Chem. Apparatur Verfahrenstechnik, **93**, 919-929.

LINKO P., CHENG Y. et MILNER M., 1960. Cereal Chem., **37**, 548-556.

LŒWUS F. A., 1952. Anal. Chem., **24**, 219.

LOSKA S. Jr. et SHELLENBERGER J. A., 1949. Cereal Chem., **26**, 129-139.

LYNCH B. T. et GLASS R. L., 1962. Cereal Chem., **39**, 256-262.

MACKENZIE R. M., 1958. Soc. Chem. Ind. Monograph n° 3.

MACLEOD A. M. et PREECE J. A., 1954. J. Inst. Brewing, **60**, 46-55.

MACMASTERS, MAJEL M. et HILBERT G. E., 1944. Cereal Chem., **21**, 548-555.

MEDCALF D. G., D'APPOLONIA B. L. et GILLES K. A., 1968. Cereal Chem., **45**, 539-549.

MENGER, Anita 1961. Bericht über die Getreidechemikertagung, Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung, A. G. Detmold, Germany.

MERCIER C., TOLLIER M. TH et GUILBOT A., 1965. Expérience « Blé longue durée », 1963-1965, Monographie C.N.E.E.M.A., 52-55.

MERCIER C., CHARBONNIÈRE R. et GUILBOT A., 1968. Die Stärke, **20**, n° 1, 6-11.

MERCIER C., 1968. Doctorat d'état, n° C.N.R.S. A.O. 2413 Paris.

MERCIER C. et FEILLET P., 1975. Cereal Chem., **52**, n° 3, part I, 283-297.

MEREDITH W. O. O., 1957. Cereal Chem., **34**, 246-251.

MEUSER F. et KEMPF W., 1970. Die Starke, **22**, 417-423.

MILNER M. et GEDDES W. F., 1954. Storage of Cereal Grains and their Products. J. A. Anderson and A. W. Alcock (Editors). American Association of Cereal Chemists, St-Paul, Minn.

MONTGOMERY R. et SMITH F., 1954. Cereal Chem., **31**, 490-494.

MONTGOMERY R. et SMITH F., 1955 A. J. Am. Chem. Soc., **77**, 2834-2837.

MONTGOMERY R. et SMITH F., 1955 B. J. Am. Chem. Soc., **77**, 3325-3328.

MONTGOMERY R. et SMITH F., 1956. J. Agr. Food Chem., **4**, 176-180.

MONTGOMERY R. et SMITH F., 1957. J. Am. Chem. Soc., **79**, 446-450.

NEUKOM H. et KUNDIG W., 1962 A. Helv. Chim. Acta, **45**, 1458-1461.

NEUKOM H., KUNDIG W., 1962 B. Chemistry and Ind. (London), april 28, 779-780.

NEUKOM H., PROVIDOLLI L., GREMLI H. et HUI P. A., 1967 A. Cereal Chem., **44**, 238-244.

NEUKOM H., GEISSMANN T. et PAINTER T. J., 1967 B. Bakers Digest, **41**, 52-57.

NEUMANN-PELSHENKE, 1954. Bread-Cereals and Bread P. Pelshenke (Editor) Paul Parey, Berlin and Hamburg, Germany.

NORTHERN REGIONAL RESEARCH LABORATORY, 1942. Mimeographed, ACE-189. U.S. Dept. Agr. : Washington, D.C.

PARTRIDGE S. M., 1946. Nature, **158**, 270-271.

PARTRIDGE S. M. et WESTALL R. G., 1948. Biochem. J., **42**, 238-250.

PENCE J. W., ELDER, ANGELINE H. et MECHAM D. K., 1950. Cereal Chem., **27**, 60-66.

PERCIVAL J., 1921. The wheat plant. Duckworth and Co. London.

PERLIN A. S., 1951. Cereal Chem., **28**, 370-381.

POLGLASE W. J., 1955. Advances in Carbohydrate Chemistry, vol. 10. Melville L., Wolfram and R. Stuart Tipson (Editors). Academic Press Inc., New-York, N. Y.

POMERANZ Y. et MACMASTERS M. M., 1968. Bakers Digest, **8**, 24-32.

RICHTER K., 1961. D.L.G. Deutsche Landwirtschafts Gesselschaft, 2. Auflage, D.L.G. Verlags GmbH, Frankfurt am Main, Germany.

RICHTER M. et SCHIERBAUM F., 1968. Die Nahrung, **12**, 189-197.

RIST C. E., 1952. Cereal Chem., **29**, 399-406.

ROBIN J. P., MERCIER C., DUPRAT F., CHARBONNIÈRE R. et GUILBOT A., 1975. Die Stärke, **27**, n° 2, 36-45.

ROHRLICH M. et ESSNER W., 1960. Getreide und Mehl, **10**, 121-125.

ROTHE M., TUNGER L. et SIBERT H. J., 1968. Ernährungsforschung, **13**, 635-650.

ROTHE M., 1972. Report of the International Association for Cereal Chemistry, Congress, Vienne, Austria.
ROTH H., SEGAL S. et BERTOLI D., 1965. Anal. Chem., **47**, 302-342.
SALO Maija-Liisa et SALMI Marja, 1968. J. Sci. Agric. Soc. Finl., **40**, 38-45.
SALO M. L. et KOTILAINEN K., 1970. J. Sci. Agric. Soc. Finl., **42**, 21-29.
SANDSTEDT R. M., JOLITZ C. E. et BLISH M. J., 1939. Cereal Chem., **16**, 780-792.
SAUNDERS R. M. et WALKER H. G. Jr., 1969. Cereal Chem., **47**, 85-92.
SAUNDERS R. M., 1971. Phytochemistry, **10**, 491-493.
SCHMORAK J., BISHOP C. T. et ADAMS G. A., 1967. Can. J. Chem., **35**, 108-114.
SCHULBACH H. H. et MULLER, 1962. J. Lieb. Ann. Chim., **578**, 194-198.
SIMPSON F. J., 1955. Can. J. Technol., **33**, 33-40.
SMIMOW V. A., SOTSKAYA V. P., NIKULINA I. D., BONDARENKO A. N. et TIKHOMIROVA L. Ya., 1966. Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya, **2**, 694-698.
SOUCI S. W., FACHMANN W. et KRAUT H., 1969. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgard, Germany.
STEVENS D. E., 1970. J. Sci. Food Agr., **21**, 31-34.
TANRET Ch., 1891. Bull. Soc. Chim. (France), **5**, 724-731.
TAUFEL K., ROMMINGER K. et HIRSCHFELD W., 1959. Z. Lebensmittel-Untersuch. Forsch. **109**, 1-12.
THATCHER R. W., 1913. J. Am. Soc. Agron., **5**, 203-213.
THATCHER R. W., 1915. J. Am. Soc. Agron., **7**, 273-382.
THIVEND P., MERCIER Ch. et GUILBOT A., 1965. Ann. Biol. Anim. Bioch., **5**, 513-526.
THIVEND P., MERCIER Ch. et GUILBOT A., 1972. Methods in Carbohydrate Chemistry, VI. Cereal Carbohydrate Methods, Roy L. Whistler and James N. BeMiller (Editors). Academic Press, New-York, and London, p. 100-105.
THOMAS B. et WINKLER S., 1968. Die Stärke, **20**, 332-337.
THOMAS B., 1972. Report of the International Association for Cereal Chemistry, Congress, Vienna, Austria.
TOLLIER M. Th., GUILBOT A. et CERNING J., 1968. Résultats non publiés.
TOLLIER M. Th. et GUILBOT A., 1969. Experience « Blé Longue durée nº 2 », 1966-1968, Monographie C.N.E.E.M.A., Antony France.
TUNGER L., 1964. Ernährungsforschung, **9**, 57-59.
UPTON E. M. et HESTER E., 1966. Cereal Chem., **43**, 156-168.
VAISEY M. et UNRAU A. M., 1964. Agr. Food Chem., **12**, 84-86.
VAN HANDEL E., 1967. Anal. Biochem., **19**, 193-194.
WHITE L. M. et SECOR G. E., 1953 A. Arch. Biochem. Biophys., **44**, 244-245.
WHITE L. M. et SECOR G. E., 1953 B. Arch. Biochem. Biophys. **43**, 60-66.
WILLIAMS K. T. et BEVENUE A., 1951. Cereal Chem., **28**, 416-423.
WINKLER S. et LUCKOW G., 1967. Die Stärke, **19**, 110-115.
WOOD H. L., 1960. Australian J. Agri. Res., **11**, 673.